

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SEKRETION DES
ENTEROGLUKAGON BEIM MENSCHEN NACH
TOTALER DUODENOPANKREATEKTOMIE**

Manfred Thiel

1979

**Aus der Abteilung für Endokrinologie
(Leiter: Prof. Dr. med. J. Beyer)
der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SEKRETION DES
ENTEROGLUKAGON BEIM MENSCHEN NACH
TOTALER DUODENOPANKREATEKTOMIE**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**

dem Fachbereich Medizin

**vorgelegt von
Manfred Thiel
aus Döbersing**

Mainz 1979



gewidmet

meiner Frau Ulrike!

Dekan: Professor Dr. med. H. Leithoff

1. Gutachter: Professor Dr. med. J. Beyer

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. B. Morsches

3. Gutachter: Professor Dr. med. K. Federlin

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.1979

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen:

Au	=	Antigen
AK	=	Antikörper
EDTA	=	Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
RIA	=	Radioimmunoassay
Zyklo-AMP	=	Adenosin-3,5-monophosphat
ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adenosintriphosphat
NADP	=	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat
GLI	=	Glucagon-like immunoreactivity
IRG	=	immunoreactive glucagon pankreatisches Glukagon
Veronal-Puffer	=	Diäthylbarbitursaures Natrium



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552619_0037

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	Einleitung	1
A.1	Wirkung des Enteroglukagons im Stoffwechsel	3
A.2	Fragestellung und geplanter Versuchsablauf	4
B.	Radioimmunoassay für Enteroglukagon	5
B.1	Prinzip der radioimmunologischen Methoden	7
B.1.1	Das Antiserum	10
B.1.2	Das Antigen	12
B.1.3	Trennung des freien vom antikörpergebundenen Glukagon	13
B.1.3.1	Durchführung der Trennung	13
B.1.3.2	Überführung des Amberlite G-400 in die Hydroxidform	14
B.1.3.3	Kontrollproben	14
B.1.4	Reagenzien und Herstellung der Lösungen	16
B.1.4.1	Benötigte Apparate	19
B.1.5	Testen der Antiseren	20
B.1.6	Untersuchungen zur Bindungskapazität	20
B.1.7	Untersuchungen zur Kinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion	21
B.1.8	Untersuchungen zur Bindungsaffinität und Erstellung von Eichkurven	21
B.1.9	Untersuchungen zur Kreuzreaktion des Antiserum AS 909 mit Sekretin und Pankreozymin	23
B.1.10	Fließschema für die Glukagonbestimmung	25
B.2	Ergebnisse	26
B.3	Diskussion	38
B.4	Zusammenfassung	40
B.5	Anhang	41

C.	Klinische Untersuchungen	<u>Seite</u>
C.1	Methodik	
C.1.1	Bestimmung der Serum-C-Peptidspiegel	45
C.1.2	Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut	46
C.1.4	Bestimmung der Insulinantikörper im Serum	46
C.1.5	Bestimmung der Enteroglukagonkonzentration im Serum mit Glukagonantiserum K 30	47
C.1.6	Ausführung der Belastungen mit Arginin und Glukose	48
C.1.7	Probennahme	48
C.1.8	Verfahren zum Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglu- kagon mittels Verdünnungskurven und Antiserum AS 909	49
C.1.9	Verfahren zum Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enterogluka- gon mittels Verdünnungskurven und Antiserum K 30	50
C.1.9.1	Gelchromatographie mit Sephadex G 50	50
C.1.10	Patienten	51
C.1.11	Auswertung	52
C.2	Ergebnisse	53
C.3	Diskussion	67
C.4	Zusammenfassung	72
C.5	Anhang	74
C.6	Literaturverzeichnis	82

A. Einleitung

Bei Enteroglukagon handelt es sich - im Gegensatz zu Sekretin und Pankreozymin - nicht um eine einheitliche Substanz. Vielmehr ist Enteroglukagon ein Sammelbegriff für eine ganze Reihe von verschiedenen Faktoren oder Substanzen des Magendarmtraktes, die mit pankreatischem Glukagon gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen (1).

Die Anwesenheit eines hyperglykämisch - glykogenolytischen Faktors im Intestinaltrakt demonstrierten erstmals Sutherland und De Duve (2). Es gelang ihnen der Nachweis, daß Extrakte aus Darmschleimhaut von Hunden die Glykogenolyse in Leberschnitten stimulierten.

Makman und Sutherland jr. zeigten, daß die Produktion von zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (Zyklo-AMP) durch die Extrakte stimuliert wird und wahrscheinlich die Vermittlerrolle zur Glykogenolyse übernimmt (3).

Spätere immunologische Studien von Samols (4), Unger (5) und Assan (6) zeigten, daß im Intestinaltrakt eine Substanz existiert, die mit den meisten Antiseren gegen pankreatisches Glukagon kreuzreagiert. Da es sich bei diesen Substanzen nicht um Glukagon handelte, sie sich jedoch wie Glukagon verhielten, wurden sie unter dem Ausdruck Enteroglukagon oder "glucagon-like immunoreactivity" (GLI) zusammengefaßt. Orci et al. (7) fanden im Intestinaltrakt Zellen, die strukturelle Ähnlichkeiten mit pankreatischen A-Zellen aufwiesen. Polak et al. (8) bestätigten dies durch Immunfluoreszenzfärbung und nannten diese Zellen EG-Zellen, um zu zeigen, daß diese Zellen Enteroglukagon bilden.

Durch Extraktion von Darmschleimhaut mit einem Alkohol-Säure-Gemisch und anschließender Säulenchromatographie mit Bio-Gel P-10 isolierten Valverde et al. (9) zwei Fraktionen. Eine Fraktion (peak II) lag im Molekulargewichtsbereich von pankreatischem Glukagon, die andere, größere Fraktion (peak I) besaß ein Molekulargewicht von ca. 7000. Hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität setzte nur die zweite, kleinere Fraktion an einer isolierten Rattenleberperfusion Glukose frei,

während die größere Fraktion keine Wirkung hatte.

Moody et al. (10) reinigten diese Substanzen weiter mittels Ionenaustauschchromatographie und erhielten acht Fraktionen, die sehr unterschiedlich mit unspezifischen Glukagonantiseren reagierten. Zum Teil interferierten sie mit einem Sekretin- und/oder Pankreozymin-Assay.

Moody et al. (11) vermuteten, daß das Enteroglukagon aus einer relativ großen Anzahl von Polypeptiden besteht und es möglich ist, daß verschiedene Nährstoffe unterschiedliche Peptide freisetzen.

Die glukoseinduzierte Freisetzung von Enteroglukagon wurde von Samols et al. (12) beschrieben. Die Vermutung, daß die Freisetzung von Enteroglukagon ein wichtiger Faktor in der glukoseinduzierten Insulinsekretion und damit in der entero-insularen Achse ist, ergibt sich aus der Tatsache, daß nach oraler Glukoseeinnahme Enteroglukagon und Insulin gleichzeitig sezerniert werden. Die in-vitro-Studie von Moody, Malaisse und Mitarb. unterstützt diese Annahme, besonders mit dem Befund, daß die Unterfraktion ϵ_1 , die am meisten Enteroglukagon enthält, auch am meisten Insulin aus inkubierten Inseln freisetzt.

Vranic et al. (13) fanden bei pankreatektomierten Hunden normale oder erhöhte Glukagonspiegel. Dieses Glukagon war immunologisch nicht von pankreatischem Glukagon zu unterscheiden. Arginininfusionen führten bei pankreatektomierten Hunden zu einem Anstieg der 3500 Molekulargewichtsfraction, während Insulin- oder Somatostatininfusionen zu deren Abfall führten (14).

Auf die speziesspezifischen Unterschiede in der Aktivität von Enteroglukagon in verschiedenen Abschnitten des Intestinaltraktes wiesen Kenny et al. (15) hin. So fanden sie im Magen von Hunden eine vierfach höhere Aktivität als im Magen des Menschen. Spätere Untersuchungen von Assan, Unger, Schopman, Samols, Sundby und Buchanan (16) bestätigten dies, jedoch waren die Enteroglukagonkonzentrationen je nach Art des verwendeten Antiserums von Autor zu Autor verschieden.

A.1 Wirkung des Enteroglukagons im Stoffwechsel

Die Wirkungen von Enteroglukagon sind bis heute vorwiegend mittels in-vitro-Experimente erforscht worden und können daher nicht als physiologisch bezeichnet werden, da die Plasmakonzentrationen der verschiedenen Fraktionen nicht bekannt sind und demnach physiologische Mengen für Experimente nicht errechnet werden können (1).

Das sind:

- a Stimulierung der Glykogenolyse in der Leber
- b Stimulierung der Insulinfreisetzung
- c Mögliche Beziehungen zwischen Enteroglukagon und dem Calciumstoffwechsel
- d Stimulierung der Lipolyse des Fettgewebes.

Von den verschiedenen Wirkungen des Enteroglukagons ist die Stimulierung der Glykogenolyse in der Leber am ehesten allgemein anerkannt. Darauf lassen die oben angeführten Versuche von Moody und Valverde schließen. Weniger eindeutig verhält es sich mit der Stimulierung der Insulinfreisetzung durch Enteroglukagon. Gegen die oben genannten Versuche von Moody, Malaisse und Mitarb. sprechen in-vivo-Experimente von Marco et al. (17). Sie zeigten an Hunden, daß Glukose die Sekretion von Insulin und Enteroglukagon gleichzeitig stimuliert, andere Zuckerarten jedoch nur Insulin. Nach der oralen Gabe von Galaktose geht der Anstieg der Insulinkonzentration zeitlich demjenigen von Enteroglukagon voraus. Ohneda et al. (18) gewannen mittels Extraktion und anschließender Chromatographie gereinigtes Enteroglukagon. Durch Infusion dieser gereinigten Extrakte in die Arteria pancreatoduodenalis stellten sie fest, daß nur die zweite Fraktion, welche im Molekulargewichtsbereich von pankreatischem Glukagon lag, die Insulinsekretion aus den B-Zellen stimuliert. Extrakte mit Enteroglukagon stimulieren die Lipolyse des Fettgewebes in vitro. Lefebvre et al. (19) fanden lipolytische Aktivität in beiden Hauptfraktionen der Darmschleimhautextrakte.

A.2 Fragestellung und geplanter Versuchsablauf

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, das Sekretionsverhalten von Enteroglukagon beim Menschen nach totaler Duodenopankreatektomie hinsichtlich Arginin- und Glukosebelastungen zu studieren. Insbesondere soll die Frage geklärt werden, ob die von Vranic (13) beim Hund gefundenen Sekretionsverhältnisse auf den Menschen übertragen werden können und ob beim Menschen im Intestinaltrakt normal funktionierende A-Zellen existieren. Ferner soll der Mechanismus der glukoseinduzierten Enteroglukagonsekretion in Abhängigkeit vom aktuellen Blutzuckerspiegel untersucht werden. Als Modell eignet sich der pankreoprive Mensch besonders, weil Kreuzreaktionen mit pankreatischem Glukagon auszuschließen sind. Da aus den bisher veröffentlichten Arbeiten nicht hervorgeht, ob die Pankreasresektion vollständig ist, werden bei den Patienten die Serum-C-Peptidspiegel bestimmt, um die Vollständigkeit des Eingriffs zu sichern.

Für die Enteroglukagonmessungen wird aus einer Reihe von Antiseren, die durch Immunisieren von Kaninchen mit pankreatischem Glukagon gewonnen wurden, ein Antiserum mit der höchsten Bindungskapazität, Bindungsaffinität und Spezifität gewählt.

Um eventuelle Kreuzreaktionen des Antiserums mit Substanzen ähnlicher Struktur wie Glukagon auszuschließen, werden hochgereinigtes Sekretin und Pankreozymin getestet.

Die Belastungen mit Arginin, intravenös, und Glukose, oral, erfolgen morgens am nüchternen Patienten und nach 25 Stunden Insulinkarenz. Gemessen werden Enteroglukagon, Blutzucker und C-Peptid.

Die Enteroglukagonspiegel werden weiterhin mit dem Antiglukagonserum K 30 von Unger gemessen, welches spezifisch für pankreatisches Glukagon ist.

Schließlich werden die immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon mittels Verdünnungskurven untersucht. Die immunologischen Eigenschaften von Enteroglukagon unter Basalsekretion werden denen unter Stimulation mit Glukose gegenübergestellt.

B. Radioimmunoassay für Enteroglukagon

Um einen Radioimmunoassay für Enteroglukagon durchführen zu können, müssen drei Dinge vorgegeben sein. Erstens ein Antiserum, welches Enteroglukagon bindet, zweitens ein Tracer, der vom Antiserum gebunden wird und drittens eine Trennungsmethode zur Trennung des freien vom Antikörper gebundenen Tracers.

Die Schwierigkeit im Radioimmunoassay für Enteroglukagon liegt darin, daß es kein Antienteroglukagonserum gibt und man gezwungen ist, Antiseren zu benutzen, die durch Immunisieren von Kaninchen mit pankreatischem Glukagon gewonnen wurden.

Unger et al. (5) zeigten, daß Darmextrakte mit Antiseren gegen pankreatisches Glukagon kreuzreagieren. Diese Kreuzreaktion bildet die Grundlage zur radioimmunologischen Bestimmung des Enteroglukagons.

Heding (20) wies nach, daß verschiedene Antiglukagonseren, die man durch Immunisieren von Kaninchen mit pankreatischen Glukagon gewann, unterschiedlich mit Enteroglukagon reagierten. Nur zwei von 27 Antiseren gingen keine Bindung mit Enteroglukagon ein und schienen spezifisch gegen pankreatisches Glukagon zu sein. Die meisten Antiseren reagierten mit Enteroglukagon und ergaben Verdünnungskurven, die nicht parallel zu pankreatischem Glukagon waren.

Eine Möglichkeit, pankreatisches Glukagon und Enteroglukagon zu bestimmen, besteht darin, ein Antiserum für die Bindung zu benutzen, welches nur pankreatisches Glukagon bindet und ein zweites Antiserum, welches die gleiche Affinität zu pankreatischem Glukagon und Enteroglukagon hat. Die Differenz aus beiden Messungen ist ein Maß für den Gehalt an Enteroglukagon (21).

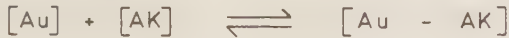
Da es keinen Standard für Enteroglukagon gibt, ergeben sich je nach Art des verwendeten Antiserums unterschiedliche Werte im Serum. Diese Begrenzung der radioimmunologischen Bestimmung für Enteroglukagon ist jedoch

unwichtig, wenn man nur die Veränderung des Enteroglukagonspiegels messen will.

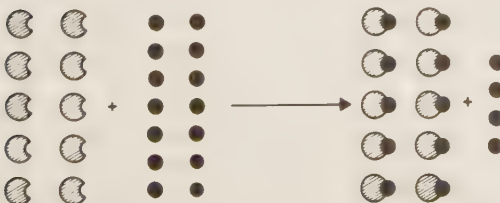
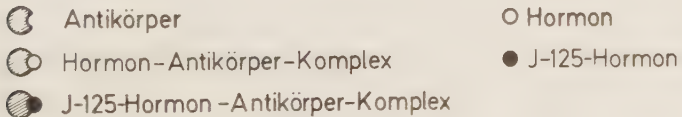
Die Unterscheidung zwischen pankreatischem Glukagon und Enteroglukagon ist im Rahmen dieser Arbeit nicht nötig, da durch die Bestimmung der Serum-C-Peptidspiegel bei pankreatektomierten Patienten sichergestellt wird, daß kein pankreatisches Glukagon in die Messungen eingeht und man daher nur das Sekretionsverhalten von Enteroglukagon untersucht.

B.1 Prinzip der radioimmunologischen Methoden

Yalow und Berson (22) wiesen erstmalig am Beispiel des Insulins 1959 darauf hin, Polypeptide im Plasma bzw. Serum radioimmunologisch zu bestimmen. Gegenüber biologischen Methoden zeichnet sich die radioimmunologische Bestimmungsmethode durch hohe Empfindlichkeit und Spezifität aus. Sie basiert auf der Proteinbindungsmethode. Nach dem Massenwirkungsgesetz stehen dabei eine Substanz Au mit einem spezifischem Eiweißkörper AK in enger Wechselbeziehung.

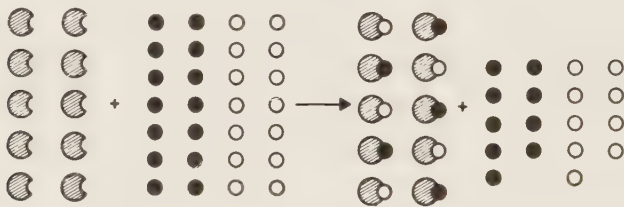


Zur radioimmunologischen Bestimmung einer Substanz Au werden spezifische Antikörper gegen diese Verbindung verwendet. Das Prinzip der radioimmunologischen Verfahren besteht in einer quantitativen Analyse der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen einem Hormon als Antigen und einem spezifischen Antikörper unter Verwendung von J-125 markiertem Hormon als Tracer. Jod geht aufgrund seiner hohen Affinität zu Tyrosin leicht eine Verbindung mit Polypeptiden ein. Wird eine bestimmte Menge eines Antikörpers mit einem Überschuß an radioaktiv markiertem Antigen zusammen gebracht, so ergibt sich:



Nach Einstellung des Gleichgewichtes wird ein Teil der Antigenmoleküle an den Antikörper gebunden, die restlichen Moleküle werden nicht gebunden, da alle Bindungsstellen der Antikörpermoleküle besetzt sind.

Zur Messung unbekannter Hormonkonzentrationen bedient man sich des Prinzips der Isotopenverdünnung. Dabei werden markierte (radioaktive) und unmarkierte Antigenmoleküle mit einer definierten Antikörpermenge inkubiert. Es stellt sich folgendes Gleichgewicht ein:



Der an den Antikörper gebundene Teil radioaktiven Antigens ist geringer als ohne Zugabe von unmarkiertem Antigen. Die Reaktion von jodmarkiertem Hormon wird durch unmarkiertes Hormon kompetitiv und quantitativ gehemmt. Mit zunehmender Konzentration an unmarkiertem Hormon nimmt der Anteil der antikörpergebundenen Radioaktivität ab, da das unmarkierte Hormon das markierte aus seiner Bindung an den Antikörper verdrängt. Sind in einem Ansatz die Menge des Antikörpers und die des radioaktiven Antigens konstant, ist der an den Antikörper gebundene Anteil umgekehrt proportional der zugegebenen Menge an nicht markiertem Antigen. Dabei wird sich für jede Menge unmarkierten Hormons ein bestimmtes Verhältnis freies zu gebundenem markiertem Hormon geben, welches man in Prozent freies oder Prozent gebundenes Hormon umrechnen kann.

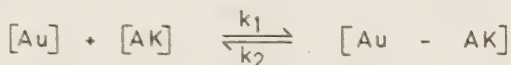
Zur Bestimmung unbekannter Hormonkonzentrationen muß man Eichkurven oder Standardkurven herstellen. Dabei werden konstanten Mengen an markiertem Hormon und Antikörper

steigende bekannte Konzentrationen des zu messenden Hormons als Standard zugesetzt. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird das an den Antikörper gebundene von dem ungebundenen Antigen unter Verwendung verschiedener Verfahren getrennt. Die Messung der Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes zeigt dann eine den verschiedenen Konzentrationen des als Standard zugesetzten unmarkierten Hormons entsprechende Abnahme der Bindung von markiertem Hormon. Bei Hormonkonzentrationsbestimmungen im Serum setzt man anstatt der Hormonstandardlösungen das Serum ein. In Abhängigkeit von seiner Konzentration wird das im Serum enthaltene Hormon markiertes Hormon aus seiner Antikörperbindung verdrängen. Durch das Ausmaß der Verdrängung kann man die Hormonkonzentration mittels der Standardkurve bestimmen.

B.1.1 Das Antiserum

Die durch Immunisierung verschiedener Tierarten gewonnenen Antiseren haben unterschiedliche Bindungseigenschaften. Auch bei Tieren innerhalb eines Stammes erhält man Antiseren, die sich in Affinität, Kapazität und Spezifität unterscheiden. Bei der Immunisierung ergibt sich nicht nur ein Antikörper, sondern das Antiserum enthält meist eine ganze Population ähnlich gebauter Antikörper, die häufig auch mit chemisch ähnlichen Verbindungen reagieren, wie sie zum Immunisieren verwendet wurden. Deshalb ist es notwendig, das für die Messung verwendete Antiserum auf seine Kreuzreaktion gegenüber ähnlich gebauten Molekülen zu untersuchen.

Ein Antiserum läßt sich durch seine Kapazität und seine Affinität charakterisieren. Da die Antigen-Antikörper-Reaktion eine Gleichgewichtsreaktion ist, unterliegt sie dem Massenwirkungsgesetz.



Die Konstante k_1 muß ebenso groß sein wie die Konstante k_2 .

Die Kapazität ist ein Maßstab für die Antigen-Antikörper-Bindung bei bestimmten Bedingungen. Die Bindungskapazität bestimmt den Grad der Antiserumverdünnung im Radioimmunoassay und wird mit dem Antikörpertiter angegeben. Er gibt an, in welcher Antiserumverdünnung 50% des zugesetzten markierten Hormons gebunden werden. Der Titer erlaubt jedoch nur dann Rückschlüsse auf den Antikörpergehalt eines Serums, wenn die Antiserumverdünnung und die Antigenmenge in Bezug gesetzt werden. Sie sind nur vergleichbar, wenn sie bei identischer Temperatur und mit gleichen Trennverfahren bestimmt werden.

Die Affinität oder Gleichgewichtskonstante gibt an, wie weit das Gleichgewicht der Antigen-Antikörper-Reaktion auf der rechten Seite liegt und ist um so größer, je größer K ist. Mit Hilfe der Standardkurve kann man die Affinität darstellen. Sie ist um so größer, je steiler der Abfall der antikörpergebundenen Radioaktivität (B/B_0) in Abhängigkeit von der nichtmarkierten Hormonmenge ist.

B.1.2 Das Antigen

Bei radioimmunologischen Methoden werden vorwiegend folgende drei Isotope verwendet:

Tritium (3-H)	Halbwertszeit: 12,7 Jahre
125-J	Halbwertszeit: 60 Tage
131-J	Halbwertszeit: 8 Tage

Wegen der längeren Halbwertszeit (60 Tage) und der leichteren Nachweisbarkeit von 125-J wird dieses Isotop bevorzugt. Zur Markierung verwendet wird Na 125-J, das durch Chloramin T in atomares Jod oxidiert und dann in einen Tyrosylrest der Proteine eingebaut wird (23).

Die spezifische Aktivität ist von der Menge des zugesetzten markierten Jods und der Anzahl der eingegangenen Bindungen mit dem einzelnen Hormonmolekül abhängig und wird in mCi/mg Hormon angegeben.

Die Technik, nach der das in den folgenden Bestimmungen benutzte Glukagon markiert wurde, basiert auf der Methode nach Greenwood und Hunter (24).

Eisentraut et al. (25) demonstrierten, daß markiertes wie unmarkiertes Glukagon während der Inkubation mit Plasma einen merklichen Verlust aufwies, der sich in einer Abnahme des gebundenen Hormons äußerte und zu falsch höheren Glukagonwerten führte. Zurückzuführen ist dieser Abbau auf die Anwesenheit proteolytischer Enzyme wie z.B. Pepsin. Durch Zugabe von Trasylol^R, einem Proteinaseinhibitor, zum Inkubationsmedium wurde dieser Verlust fast vollständig verhindert. Mirsky et al. (26) wiesen schon 1959 durch in-vitro-Studien die starke Fähigkeit des Plasmas nach, Glukagon abzubauen. Der Abbau von markiertem Glukagon im Plasma ist abhängig von der Zeit, der Temperatur und der Anwesenheit hämolysierter Erythrozyten (27).

B.1.3 Trennung des freien vom antikörpergebundenen Glukagon

Verschiedene Methoden sind bisher beschrieben worden, um nach einer bestimmten Inkubationszeit das freie vom antikörpergebundenen Hormon zu trennen.

Unger et al. (28) benutzten im ersten Radioimmunoassay für Glukagon die Chromatographiemethode auf Whatman 3 MM Papier. Eine Reihe von anderen Trennverfahren folgte:

Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes mit Natriumsulfat (29), Immunpräzipitation (30) oder Äthanol(21). Adsorption des freien Hormons an Zellulose (31), an Amberlite (32) oder an Dextran-Aktivkohle (33).

Für die nachfolgenden Bestimmungen wurde die Trennung mittels Amberlite G-400 gewählt, weil es besonders einfach zu handhaben ist.

Amberlite G-400 ist ein Kunstharzanionenaustauscher und bindet in seiner Hydroxidform freies Glukagon, während der Antigen-Antikörper-Komplex im Überstand verbleibt. Nach dem Zentrifugieren wird ein aliquoter Teil des Überstandes abpipettiert und die Radioaktivität gemessen. Durch mitgeführte Leerproben wird die unspezifische, d.h. die nicht durch spezifische Antikörper gebundene Radioaktivität des Überstandes bestimmt und muß bei der späteren Berechnung berücksichtigt werden.

B.1.3.1 Durchführung der Trennung

Nach der Inkubationszeit wird die Gesamtaktivität im Gammastrahlenzähler gemessen, die der zugesetzten Menge an radioaktiv markiertem Glukagon entspricht. In jedes Röhrchen gibt man nun ca. 200mg Amberlite G-400 (OH-Form), verschließt die Röhrchen mit einem Stopfen und läßt sie 30 Minuten auf einem Schüttelgerät rotieren. Anschließend werden die Röhrchen 10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Diese Zeiten sind sehr genau einzuhalten, da es bei längerem Schütteln oder Zentrifugieren zur Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes

kommen könnte. Es sollten aus diesem Grunde nicht mehr als 50 Röhrchen gleichzeitig bearbeitet werden. Nach dem Zentrifugieren werden vom Überstand 1 ml abpipettiert, in ein 2 ml Plastikröhrchen gegeben, mit einem Stopfen verschlossen und die Radioaktivität im Gammastrahlenzähler gemessen. Da das Gesamtvolumen des Inkubationsmediums 2 ml beträgt und nach dem Zentrifugieren 1 ml abpipettiert und gemessen werden, verringern sich die Absolutwerte der einzelnen Stoffe auf die Hälfte. Zur Vereinfachung des Rechenverfahrens wird im folgenden jedoch mit den Absolutwerten/Ansatz gerechnet.

B.1.3.2 Überführung des Amberlite G-400 in die Hydroxidform

250g Amberlite G-400 werden in 2 Liter 2n NaOH-Lösung 2 Std. bei Zimmertemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Der Überstand an Natronlauge wird nach der Sedimentation abdekantiert, das Sediment mit Wasser versetzt und mit einem Büchner-Trichter mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wird der Satz zuerst mit Leitungswasser, dann mit aqua dest. gewaschen, bis das abgesaugte Wasser neutral reagiert. Im Trockenschrank wird das Harz 6 Std. bei 80°C getrocknet. Das Harz soll sofort verwendet werden und ist vor jedem Ansatz frisch herzustellen.

B.1.3.3 Kontrollproben

Bei Proteinlösungen, die mit fremden Proteinen versetzt werden, muß mit unspezifischen Reaktionen gerechnet werden:

- a Hydrolyse
- b enzymatische Spaltung
- c Molekülzerfall durch Autoradiolyse

Radioaktive Fragmente des markierten Glukagons können an Serumproteine angelagert werden und so eine unspezifische Vermehrung der echten antikörpergebundenen Radioaktivität bewirken. In einem Kontrollansatz wird allein das markierte Rinderglukagon mit der zu testenden Proteinlösung (Serum) inkubiert.

B.1.4 Reagenzien und Herstellung der Lösungen

J-125-Glukagon Rinderglukagon:

spezifische Aktivität: 150-178mCi/mg

Konzentration : 5ng/ml

Menge : 2ml

Behringwerke AG, Marburg, Lahn

Rinderglukagon, kristallisiert

Calbiochem, San Diego Calif.

Amberlite G-400, prakt.

Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

Diäthylbarbitursaures Natrium

Jodacetamid, p.a.

Serumalbumin vom Rind, reinst, Behringwerke

Salzsäure, 1n p.a.

Natronlauge, 2n p.a.

Trasylol, 200000 KIE in 10ml, Bayer, Leverkusen

Natriumazid

Sekretin, hochgereinigt, glukagonfrei

Karolinska Institut, Schweden

Pankreozymin, hochgereinigt, glukagonfrei

Karolinska Institut, Schweden

Glukagonantiseren vom Kaninchen

Argininmonochlorid 50g Arginin in 250ml phys. Kochsalzlösung, Merck

Gluko-50 Probetrunk, 50g Glukose in 110ml,
Boehringer Mannheim

Sephadex G 50, superfine, Particle size: 10-40 μ

Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden

Rhodalbumin 20%, Humanalbumin, Rhodia Pharma GmbH, Norderstedt

Essigsäure, 96% p.a. Fa. Merck

Herstellung der Veronalpufferlösung

10,3g (0,05Mol) 5,5 Diäthylbarbitursäure (Na-Salz), 5g Jodacetamid und 1g Natriumazid werden in aqua dest. gelöst und auf 960ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung werden 4 Ampullen zu je 10ml Trasylol (1 Ampulle = 200000 KIE) gegeben. Kurz vor dem Gebrauch werden in der Lösung 10g Rinderalbumin, reinst gelöst und mit 1n Salzsäurelösung auf pH 8,6 titriert.

Herstellung der markierten Glukagonlösungen

Zum Testen der Antiseren und zu den Untersuchungen zur Kinetik werden 10ng (=2ml) J-125-Glukagon mit Veronalpuffer pH 8,6 in 50ml gelöst. 0,5ml dieser Lösung entsprechen 100pg J-125-Glukagon.

Zur Erstellung der Standardkurven und zur Messung der Konzentrationen im Serum werden 10ng (=2ml) J-125-Glukagon in 40ml Veronalpuffer pH 8,6 gelöst. 0,1ml dieser Lösung entsprechen 25pg J-125-Glukagon.

Antiserumverdünnung

Zur Erstellung der Standardkurven und zur Messung der Konzentrationen im Serum wird das frisch aufgetaute Antiserum mit Veronalpuffer pH 8,6 1:1000 verdünnt. Dazu werden 0,1ml Antiserum in 100ml Puffer gelöst. 0,2ml dieser Lösung entsprechen in einem Inkubationsvolumen von 2ml einer finalen Verdünnung von 1:10000.

Zum Testen der Antiseren werden finale Verdünnungen von 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 und 1:10000 verwendet.

Für die Untersuchungen zur Kinetik werden finale Verdünnungen von 1:2000 benutzt.

Herstellung der Standardglukagonlösungen

10mg Rinderglukagon werden eingewogen, in 8ml Veronalpuffer pH 8,6 suspendiert und mit ca. 0,3ml 1/20n NaOH-Lösung versetzt, bis die Lösung klar wird. Der Meßkolben wird mit Veronalpuffer auf 10ml aufgefüllt. 0,1ml dieser Lösung werden mit Puffer auf 10ml aufgefüllt. Man erhält somit eine Lösung von 10 μ g/ml, die in Portionen von 0,5ml bei -20°C aufbewahrt werden kann. 0,1ml der frisch aufgetauten Lösung werden mit Veronalpuffer pH 8,6 auf 10ml aufgefüllt. Man erhält so eine Arbeitslösung von 100ng Glukagon/ml, mit deren Hilfe weitere Glukagonlösungen von 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100 und 50pg Glukagon/0,2ml hergestellt werden.

B.1.4.1 Benötigte Apparate

Plastik Test Tubes Polystyrol-Röhrchen, 16x100mm und
11x70mm, Fa. Greiner Nürtingen

Zentrifuge Cryofuge 6-6, Fa. Christ

Gammazähler Gamma-set 500 ICN Tracerlab

Marburgpipetten mit auswechselbarer Plastikspitze, Eppendorf

Präzisionswaage Fa. Sartorius

Analysenwaage Fa. Sartorius

Schüttelapparatur Heidolph-Reax-Ria-Rotator

Magnetrührer

Glasmeßkolben verschiedener Größe, Fa. Schott

Trockenschrank

Wasserstrahlpumpe

Büchner-Trichter

Bechergläser verschiedener Größe, Fa. Schott

B.1.5 Testen der Antiseren

Zur Verfügung stehen 63 Antiseren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit Rinderglukagon gewonnen wurden.

Durchführung der Bestimmung

0,2ml Antiserum (1:10) verdünnt werden mit 0,5ml J-125-Glukagonlösung und 1,3ml Veronalpuffer pH 8,6 bei Zimmertemperatur 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgt die Trennung des freien vom antikörpergebundenen J-125-Glukagon mittels Amberlite G-400 (OH-Form). Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Diejenigen Seren, die über 70% des markierten Hormons gebunden hatten, werden weiter auf ihre Empfindlichkeit getestet.

B.1.6 Untersuchungen zur Bindungskapazität

Von sieben Antiseren werden finale Verdünnungsreihen von 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 und 1:10000 angesetzt. Dazu werden 0,2ml entsprechend verdünntes Antiserum mit 0,5ml J-125-Glukagonlösung und 1,3ml Veronalpuffer pH 8,6 24 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Trennung des freien vom antikörpergebundenen J-125-Glukagon mittels Amberlite G-400 (OH-Form). Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Diejenigen Seren mit der höchsten Bindungskapazität werden weiter auf ihre Bindungsaffinität untersucht.

B.1.7 Untersuchungen zur Kinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion

Da die Antigen-Antikörper-Reaktion nach dem Massenwirkungsgesetz abläuft, stellt sich das Gleichgewicht der Reaktion erst nach einer bestimmten Zeit ein.

Untersucht werden drei Antiseren: AS 907, AS 909 und AS 981.

Durchführung der Bestimmung

0,2ml der jeweiligen Antiseren (finale Verdünnung 1:2000) werden mit 0,5ml J-125-Glukagonlösung und 1,3ml Veronalpuffer pH 8,6 bei 4°C 3, 6, 18, 48 und 72 Stunden inkubiert. Danach erfolgt die Trennung des freien vom antikörpergebundenen J-125-Glukagon mittels Amberlite G-400 (OH-Form). Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die nachfolgenden Untersuchungen werden bei der optimalen Inkubationszeit und bei 4°C durchgeführt.

B.1.8 Untersuchungen zur Bindungsaffinität und Erstellung von Eichkurven

Diejenigen Antiserumverdünnungen, welche 25-50% des Tracers binden, können im Radioimmunoassay verwendet werden, vorausgesetzt, unmarkiertes Hormon bewirkt eine ausreichende Verdrängung des antikörpergebundenen Tracers. Das beste Antiserum ist dasjenige, bei dem mit der geringsten Menge unmarkierten Hormons der größte Anteil markierten Hormons verdrängt wird. Wichtig ist ferner, daß eine relativ kleine Menge unmarkierten Hormons einen relativ großen Verdrängungseffekt zeigt, d.h. eine relativ starke Abnahme der antikörpergebundenen Radioaktivität, besonders im Meßbereich der zu erwartenden Hormonkonzentration.

Durchführung der Bestimmung

0,2ml der Antiseren AS 907, AS 909 und AS 981 (finale Verdünnung 1:10000) werden mit 0,1ml J-125-Glukagonlösung (=25pg) und 1,5ml Veronalpuffer pH 8,6 versetzt. Zu dieser Lösung gibt man 0,2ml unmarkierte Glukagonlösung in den entsprechenden Konzentrationen von 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100 und 50pg. Nach guter Durchmischung erfolgt die Inkubation bei 4°C und 72 Stunden. Danach erfolgt die Trennung des freien vom antikörpergebundenen J-125-Glukagon mittels Amberlite G-400 (OH-Form). Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Wahl des geeignetsten Antiserums erfolgt nach den in B.1.1 genannten Kriterien.

B.1.9 Untersuchungen zur Kreuzreaktion des Antiserums
AS 909 mit Sekretin und Pankreozymin

Glukagon (29 Aminosäuren) und Sekretin (27 Aminosäuren) haben 13 Aminosäuren gemeinsam an derselben Stelle der Kette vom N-terminalen Ende aus gesehen. Sieben der ersten acht Aminosäuren sind identisch und es könnte die Möglichkeit bestehen, daß einige Antiseren mit Sekretin und/oder Pankreozymin interferieren.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wird das Antiserum AS 909, welches für die Messungen verwendet wird, getestet.

Berechnet wird die Kreuzreaktion einer Substanz X mit einem Antikörper gegen Antigen A aus:

- a) der Menge an unmarkiertem Antigen A, die 50% des radioaktiven Antigens aus der Bindung an den Antikörper verdrängen kann (A50%) und
- b) aus der Menge an Substanz X, die ebenfalls 50% des radioaktiven Antigens A aus der Antikörperbindung verdrängen kann (X50%) (34).

$$\text{Kreuzreaktion C} = \frac{\text{A50\%}}{\text{X50\%}} \times 100$$

Hochgereinigtes Sekretin und Pankreozymin (beide glukagon-frei) werden anstatt unmarkierten Hormons den Ansätzen in steigenden Mengen von 0 bis 500ng zugesetzt und nach der entsprechenden Inkubationszeit und Trennung des freien Tracers auf ihren Verdrängungseffekt hin untersucht und mit den üblichen Standardkurven verglichen. Von besonderer Wichtigkeit bei der Bestimmung der Kreuzreaktion ist die absolute Einhaltung identischer Bedingungen, sowohl bei der Erstellung der Standardkurve, als auch bei der Reaktion mit der zu testenden Substanz. Deshalb müssen beide Reaktionen in zwei parallel verlaufenden Versuchen verglichen werden.

Durchführung der Bestimmung

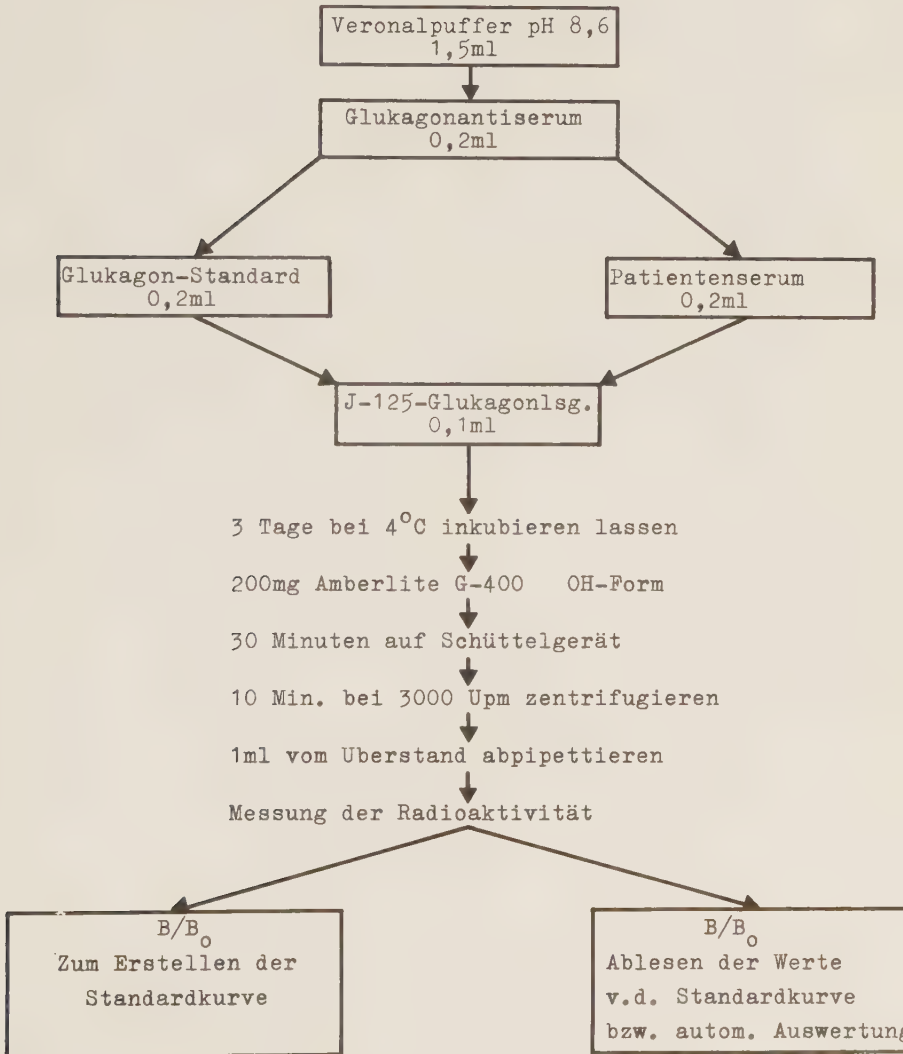
Die Erstellung der Standardkurve erfolgt nach der in B.1.8 genannten Methode.

Zur Untersuchung der Kreuzreaktion werden 1mg Sekretin bzw. Pankreozymin in 1ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. 0,1ml dieser Lösung werden mit Veronalpuffer pH 8,6 auf 10ml aufgefüllt. Man erhält so eine Lösung von 10 μ g/ml, mit deren Hilfe weitere Sekretin- bzw. Pankreozyminlösungen von 500, 100, 50, 10, 5, 2ng und 500, 200, 100, 50pg/0,2ml hergestellt werden.

0,2ml des Antiserums AS 909 (finale Verdünnung 1:10000) werden mit 0,1ml J-125-Glukagonlösung (=25pg) und 1,5ml Veronalpuffer pH 8,6 versetzt. Zu dieser Lösung gibt man 0,2ml Sekretin- bzw. Pankreozyminlösung in den entsprechenden Konzentrationen von 0 bis 500ng. Nach guter Durchmischung erfolgt die Inkubation bei 4°C und 72 Stunden. Danach erfolgt die Trennung des freien vom antikörpergebundenen J-125-Glukagon mittels Amberlite G-400 (OH-Form). Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Anschließend wird die Kreuzreaktion mit Hilfe der in B.1.9 genannten Formel errechnet.

B.1.10 Fließschema für die Glukagonbestimmung



B.2 Ergebnisse

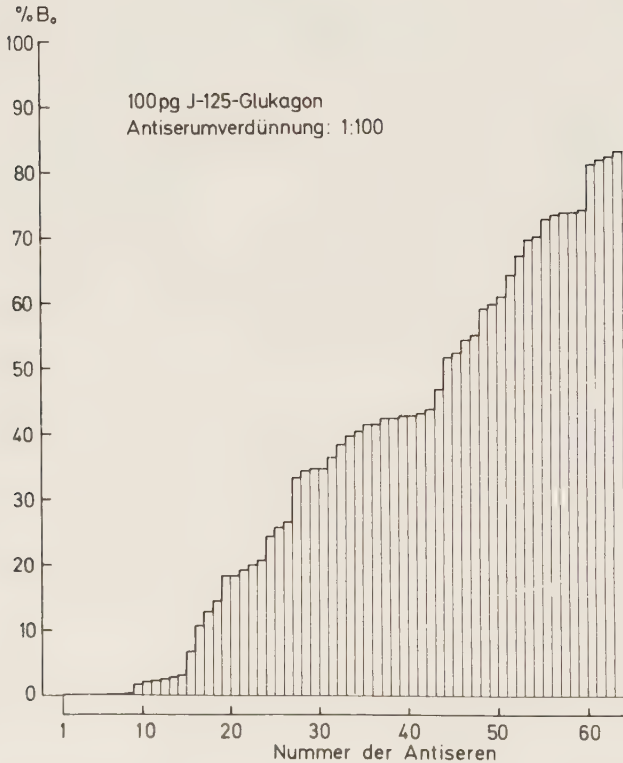


Abbildung 1: Bindungsfähigkeit von 63 Antiseren in Gegenwart von 100 pg J-125-Glukagon und einer finalen Antiserumverdünnung von 1:100

Abbildung 1 zeigt die sehr unterschiedlichen Bindungseigenschaften der 63 getesteten Antiseren. Sieben Antiseren gingen keine Bindung mit J-125-Glukagon ein. Nur

neun Antiseren (AS 909, AS 981, AS 897, AS 907, AS 975, AS 985, AS 987, AS 977 und AS 907K) haben über 70% des J-125-Glukagon gebunden und sind für die weitere Verwendung hinsichtlich ihrer Bindungskapazität brauchbar. Die restlichen Antiseren sind zwar fähig, in unterschiedlichem Maße J-125-Glukagon zu binden, doch wird ihre Bindungskapazität nicht ausreichen, den Erfordernissen des Radioimmunoassays zu entsprechen.

Acht Antiseren banden zwischen null und zehn Prozent, sieben zwischen zehn und zwanzig Prozent, vier zwischen zwanzig und dreißig Prozent, sieben zwischen dreißig und vierzig Prozent, zehn zwischen vierzig und fünfzig Prozent, sechs zwischen fünfzig und sechzig Prozent und fünf zwischen sechzig und siebenzig Prozent des J-125-Glukagon.

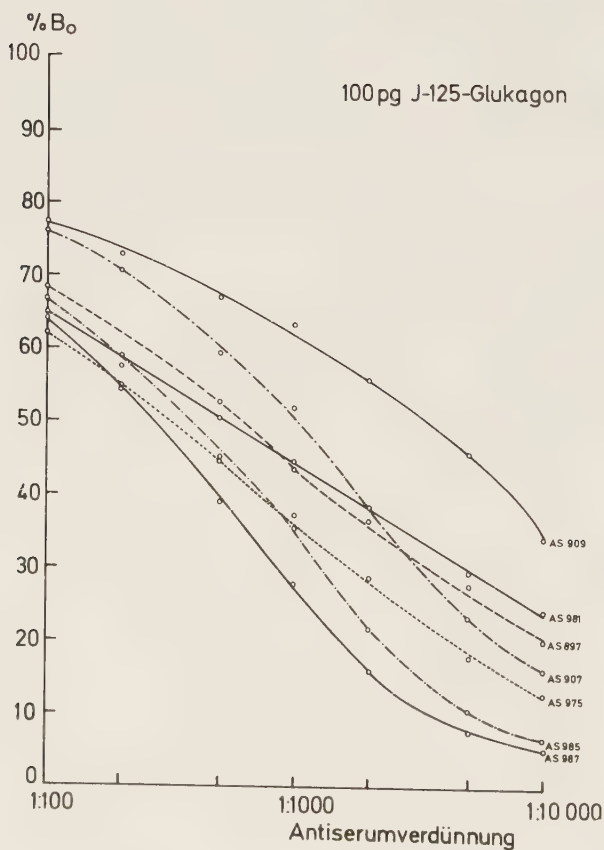


Abbildung 2: Verdünnungskurven von sieben Antisera in Gegenwart von 100pg J-125-Glukagon

Abbildung 2 zeigt das Verhalten von sieben Antisera in bezug auf ihre Bindungskapazität bei verschiedenen Antiserumverdünnungen und konstanter J-125-Glukagon-Menge.

AS 907, AS 909 und AS 981 haben den größten Antikörpertiter und zeigen selbst bei einer Verdünnung von 1:10000 noch hohe Bindungswerte.

Obwohl die restlichen Antiseren in der Verdünnung von 1:100 gute Bindungswerte zeigen, ist der Abfall des gebundenen J-125-Glukagon bei weiterer Antiserumverdünnung zu groß und damit der Antikörpertiter zu klein.

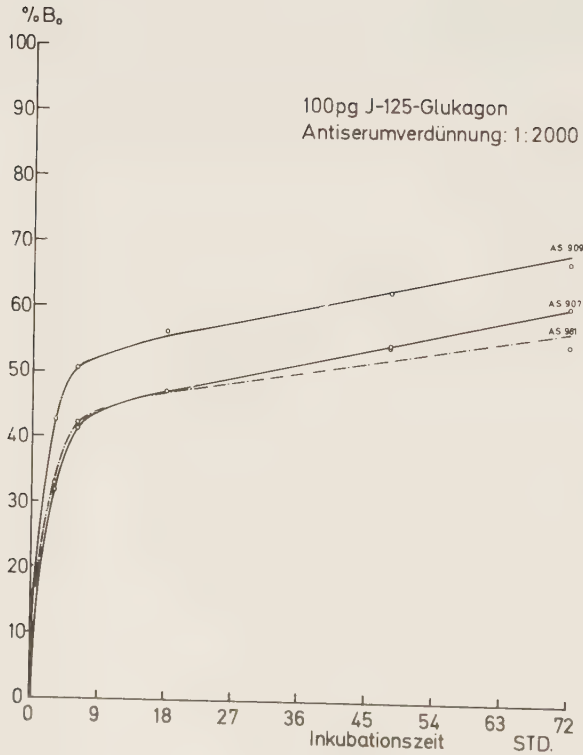


Abbildung 3: Abhängigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion von der Zeit

Abbildung 3 zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion der Antiseren AS 907, AS 909 und AS 981 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Anti-

seren AS 907 und AS 981 zeigen fast gleichen Verlauf, d.h. steilen Anstieg in den ersten sechs Stunden, um nach 18 Stunden in einen fast linearen Verlauf überzugehen. Sowohl Bindungsfähigkeit als auch Umsatzgeschwindigkeit sind beim Antiserum AS 909 größer als bei den anderen Antiseren. Damit läßt sich feststellen, daß die Umsatzgeschwindigkeit $\Delta B_o / \Delta t$ in den ersten sechs Stunden am größten ist, unabhängig vom Antiserum. Das Gleichgewicht der Antigen-Antikörper-Reaktion ist nach 72 Stunden noch nicht erreicht, was am stetigen Anstieg der antikörpergebundenen Radioaktivität leicht zu erkennen ist.

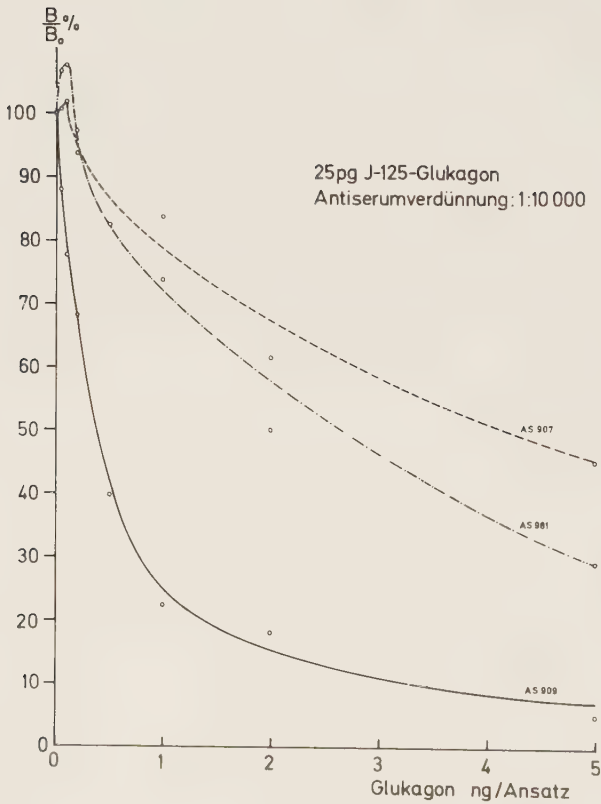


Abbildung 4: Glukagonstandardkurven mit 3 Antiseren unterschiedlicher Bindungsaffinität

Abbildung 4 zeigt die Bindungsaffinität der Antiseren AS 907, AS 909 und AS 981 in Abhängigkeit von der Menge unmarkierten Glukagons. Die Antiseren AS 907 und AS 981

weisen im Bereich von 0 bis 100pg unmarkierten Glukagons das sogenannte "hook-Phänomen" auf, d.h. eine Zunahme der antikörpergebundenen Radioaktivität und nicht, wie im Normalfall, eine Abnahme. Dagegen führt die Zugabe unmarkierten Glukagons beim Antiserum AS 909 zu einer guten Verdrängung der antikörpergebundenen Radioaktivität, besonders im Bereich zwischen 0 und 500pg Glukagon. Die antikörpergebundene Radioaktivität zeigt in diesem Bereich eine Abnahme von 100% auf 39,7%. Das Antiserum AS 909 hat also eine größere Bindungsaffinität als die Antiseren AS 907 und AS 981.

Abbildung 5 zeigt im halblogarithmischen Maßstab besonders deutlich, daß im Bereich zwischen 0 und 500pg eine relativ kleine Menge unmarkierten Glukagons einen relativ großen Verdrängungseffekt zeigt und somit die Meßgenauigkeit erhöht.

Abbildung 6 zeigt noch einmal die Standardkurve mit dem Antiserum AS 909 in der Logit-log-Transformation. Im Bereich zwischen 50pg und 5000pg ergibt sich eine lineare Abnahme der antikörpergebundenen Radioaktivität.

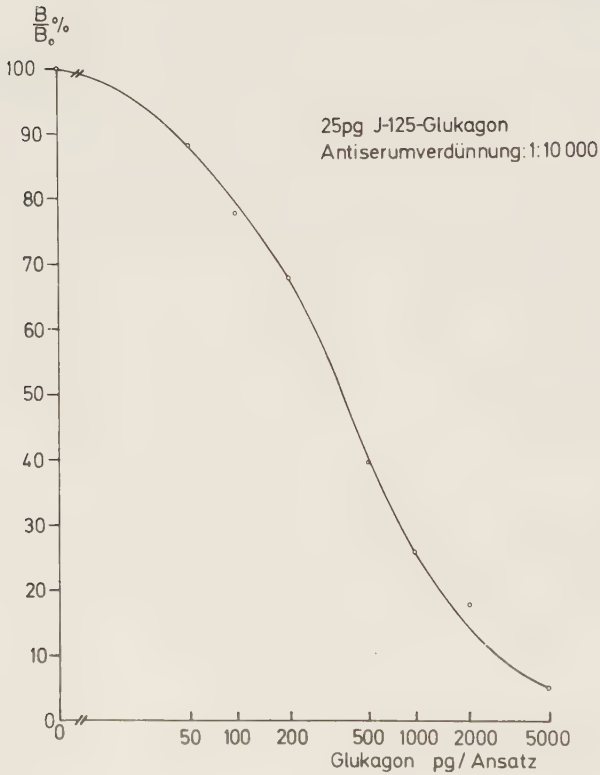


Abbildung 5:

Glukagonstandardkurve mit Antiserum AS 909, dargestellt im halblogarithmischen Maßstab

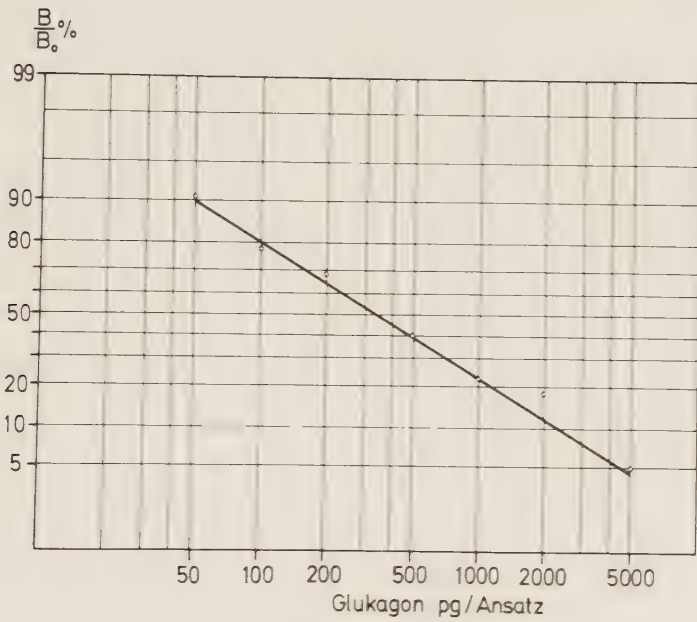


Abbildung 6:

Glukagonstandardkurve mit Antiserum AS 909, dargestellt in der Logit-log-Transformation

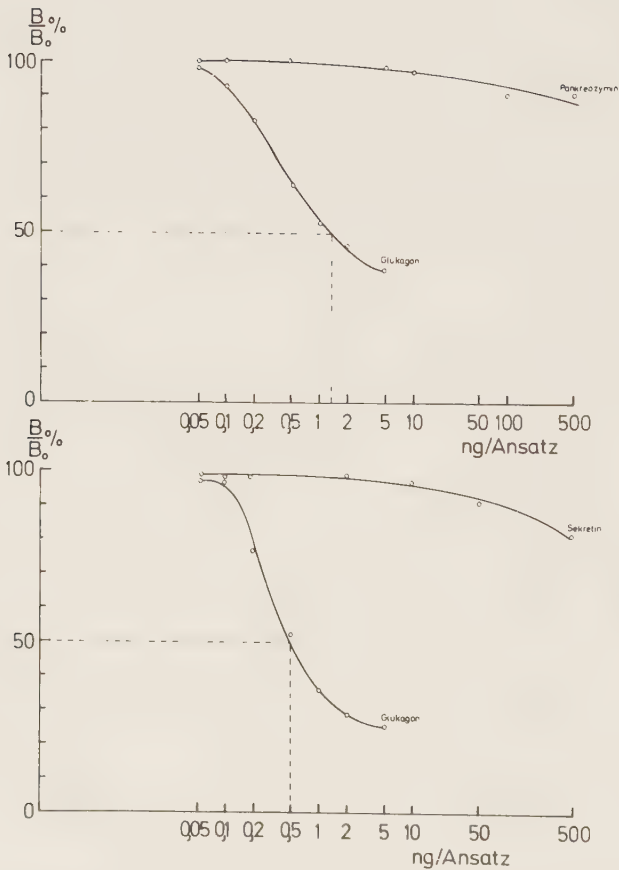


Abbildung 7: Verhalten des Antiserums AS 909 in bezug auf seine Kreuzreaktion mit hochgereinigtem Sekretin und Pan-kreozymin

Abbildung 7 zeigt die Glukagonstandardkurven bzw. die Kreuzreaktionskurven des Antiserums AS 909 mit hochge-

reinigtem Sekretin und Pankreozymin. Wie aus beiden Versuchen mit Sekretin bzw. Pankreozymin zu ersehen ist, ist der Verdrängungseffekt von Sekretin bzw. Pankreozymin selbst in 100-fach höheren Konzentrationen als Glukagon so gering, daß man praktisch eine Kreuzreaktion zwischen Glukagon und Sekretin bzw. Pankreozymin ausschließen kann. ($0 \ll 1\%$).

B.3 Diskussion

Bei der Einführung des Radioimmunoassays vor mehr als 15 Jahren hielt man die Antiseren, welche im Assay verwendet wurden, für extrem spezifisch (35). Dies ist jedoch nicht der Fall. Es ist anzunehmen, daß Glukagon mehr als nur eine immunogen wirkende Stelle im Molekül besitzt. Enteroglukagon hat vermutlich teilweise eine Aminosäuresequenz mit pankreatischem Glukagon gemeinsam und ist deshalb fähig, mit vielen Glukagonantiseren zu reagieren.

Die beim Immunisieren gebildeten Antiseren unterscheiden sich nicht nur von Spezies zu Spezies, sondern auch von Tier zu Tier innerhalb eines Stammes. Bei 63 Antiseren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit pankreatischem Glukagon gewonnen wurden, gingen sieben überhaupt keine Bindung mit J-125-Glukagon ein, nur neun Antiseren hatten über 70% J-125-Glukagon gebunden. Die restlichen Antiseren waren zwar fähig, in unterschiedlichem Maße J-125-Glukagon zu binden, jedoch reichte ihre Bindungsfähigkeit nicht aus, um den Erfordernissen eines Radioimmunoassays zu entsprechen.

Ein Antiserum, welches im Radioimmunoassay für Glukagon verwendet wird, soll nicht nur einen hohen Antikörpertiter haben, sondern muß auch hinsichtlich Bindungsaffinität und Spezifität geeignet sein. Das Antiserum AS 909 erfüllt diese Bedingungen, da es in einer hohen Verdünnung (1:10000) im Radioimmunoassay verwendet werden kann. Hinsichtlich der Bindungsaffinität ist beim Antiserum AS 909 der Verdrängungseffekt des unmarkierten Glukagons besonders im Bereich der zu erwartenden Serumhormonkonzentration am größten, was die Meßgenauigkeit ganz entscheidend verbessert. Das Antiserum AS 909 scheint spezifisch zu sein für Glukagon bzw. Enteroglukagon, da es nicht

mit ähnlich gebauten Molekülen wie z.B. Sekretin und Pankreozymin im Radioimmunoassay interferiert.

Obwohl, wie Abbildung 3 zeigt, die Reaktionsgeschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion in den ersten sechs Stunden am größten ist und man nach ca. 18 Stunden das freie vom antikörpergebundenen Glukagon trennen könnte, werden die Ansätze bei 72 Stunden inkubiert, da dadurch die antikörpergebundene Radioaktivität größer ist und somit die Meßgenauigkeit (Zählrate) erhöht wird. Es ist nicht erforderlich, mit der Trennung des freien vom antikörpergebundenen Glukagon bis zur Einstellung des Gleichgewichtes der Antigen-Antikörper-Reaktion zu warten, weil die Änderung der Bindung pro Zeiteinheit nur noch sehr gering ist.

Um den enzymatischen Abbau von Glukagon bzw. Enteroglukagon durch proteolytische Enzyme zu verhindern, werden die Ansätze mit 800 KIE Trasylol^R/ml Inkubationsvolumen inkubiert. Eventuelle bakterielle Kontamination und die daraus resultierende Zersetzung des Inkubationsmediums werden mit 0,1% Natriumazid verhindert.

B.4 Zusammenfassung

Es wurde eine radioimmunologische Bestimmungsmethode für Enteroglukagon entwickelt.

Aus 63 Antisera, die durch Immunisierung von Kaninchen mit pankreatischem Glukagon gewonnen wurden, wurde ein Antiserum mit der höchsten Bindungskapazität, Bindungsaffinität und Spezifität ausgewählt.

Um eventuelle Kreuzreaktionen mit Substanzen ähnlicher Struktur wie Glukagon auszuschließen, wurden hochgereinigtes Sekretin und Pankreozymin getestet und keine Kreuzreaktion festgestellt.

Das Inkubationsvolumen des Radioimmunoassays beträgt 2ml. Das Antiserum AS 909 hat eine Endverdünnung von 1:10000 in Gegenwart von 25pg J-125-Glukagon und 1600 KIE Trasylol^R. Das Antiserum AS 909 spricht bereits auf 50pg Glukagon in einem Volumen von 2ml mit einer guten Verdrängung an. Die Inkubation erfolgt in Veronalpuffer (0,05M) pH 8,6 mit 1% Rinderserumalbumin, 0,1% Natriumazid und 0,5% Jodacetamid. Die Trennung des freien vom antikörpergebundenen Glukagon erfolgt nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 4°C mittels Amberlite-G-400 (OH-Form).

B.5 Anhang

Tabellen:

1. Testen der Antiseren

Nummer der Antiseren	Bezeichnung der Antiseren	% B ₀
1	AS 892	0
2	AS 539	0
3	AS 540	0
4	AS 543	0
5	AS 544	0
6	AS 603	0
7	AS 643	0
8	AS 983	0,2
9	AS 10	1,7
10	AS 541	2,1
11	AS 896	2,2
12	AS 886	2,5
13	AS 9	2,8
14	AS 542	3,0
15	AS 976	6,7
16	AS 545	10,6
17	AS 980	12,8
18	AS 650	14,5
19	AS 976	18,4
20	AS 978	18,4
21	AS 903	19,1
22	AS 888	19,9
23	AS 547	20,6
24	AS 980	24,4
25	AS 560	25,6
26	AS 913	26,5
27	AS 979	33,2
28	AS 984	34,3
29	AS 977	34,7
30	AS 912	34,7
31	AS 915	36,4
32	AS 902	38,2
33	AS 899	39,7
34	AS 978	40,2
35	AS 910	41,4
36	AS 988	41,5
37	AS 975	42,3
38	AS 986	42,4
39	AS 974	42,6
40	AS 889	42,7
41	AS 986	42,9
42	AS 901	43,7

Fortsetzung der Tabelle

Nummer der Antiseren	Bezeichnung der Antiseren	% B ₀
43	AS 985	46,8
44	AS 988	51,8
45	AS 911	52,1
46	AS 883	54,2
47	AS 1	54,8
48	AS 974	59,1
49	AS 641	59,7
50	AS 890	60,8
51	AS 985	64,2
52	AS 982	67,1
53	AS 884	69,6
54	AS 908	70,0
55	AS 981	72,7
56	AS 909	73,4
57	AS 977	73,7
58	AS 987	73,7
59	AS 975	73,9
60	AS 987	80,9
61	AS 985	81,5
62	AS 907 K	82,1
63	AS 907	82,8

2. Untersuchungen zur Bindungskapazität

% B ₀	Antiserumverdünnung, final						
	1:100	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
Antiserum							
AS 897	68,4	60,0	52,7	43,3	36,3	27,8	19,8
AS 907	76,1	70,6	59,2	52,0	38,3	23,2	16,1
AS 975	62,0	54,5	44,4	35,3	28,6	17,6	12,7
AS 981	64,8	58,8	50,4	44,2	38,3	29,2	24,0
AS 987	64,1	54,4	38,8	27,6	15,7	7,5	5,0
AS 985	66,9	57,4	44,8	37,0	21,6	10,7	6,5
AS 909	77,1	72,5	66,9	63,4	55,7	45,6	34,0

3. Untersuchungen zur Kinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion

t/Std.	% B ₀		
	AS 907	AS 909	AS 981
3	31,3	42,8	32,9
6	41,3	50,8	42,3
18	47,4	56,4	47,1
48	54,3	62,5	54,1
72	60,8	67,2	54,8

4. Untersuchungen zur Bindungsaffinität und Erstellung von Eichkurven

ng Glukagon	B/B ₀ %		
	AS 907	AS 909	AS 981
0	100	100	100
0,05	100,9	88,1	106,6
0,1	102,0	77,7	107,6
0,2	93,8	68,0	97,2
0,5	96,3	39,7	82,3
1,0	83,6	22,3	73,5
2,0	61,3	18,0	50,1
5,0	45,4	4,9	29,2

5. Untersuchungen zur Kreuzreaktion

		B/B ₀ %	
ng Glukagon	ng Sekretin	Standardkurve	Kreuzreaktion
0	0	100,0	100,0
0,05	0,05	96,5	98,4
0,1	0,1	96,7	98,0
0,2	0,2	76,7	98,2
0,5	2,0	52,2	98,8
1,0	10,0	36,1	96,4
2,0	50,0	28,4	90,3
5,0	500,0	25,3	81,5

		B/B ₀ %	
ng Glukagon	ng Pankreozymin	Standardkurve	Kreuzreaktion
0	0	100,0	100,0
0,05	0,05	97,7	99,8
0,1	0,1	92,7	100,0
0,2	0,5	82,4	100,3
0,5	5,0	63,7	98,2
1,0	10,0	52,9	96,9
2,0	100,0	45,8	90,1
5,0	500,0	39,0	90,0

C. Klinische Untersuchungen

C.1 Methodik

C.1.1 Bestimmung der Serum-C-Peptidspiegel

Proinsulin wird durch spezifische Proteinasen in Insulin und C-Peptid gespalten (36). C-Peptid wird in äquimolaren Mengen mit Insulin von der B-Zelle sezerniert, so daß unter der Gabe von exogenem Insulin durch Bestimmung der Serum-C-Peptidspiegel das Sekretionsverhalten der B-Zelle gemessen werden kann. Beim Menschen darf nach totaler Duodenopankreatektomie keine Aktivität von B-Zellen nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Serum-C-Peptidspiegel gestattet es zu beurteilen, ob noch sekretorisch aktives Pankreasgewebe vorhanden ist und damit die Anwesenheit von pankreatischem Glukagon ausgeschlossen werden kann.

Durchführung der Bestimmung

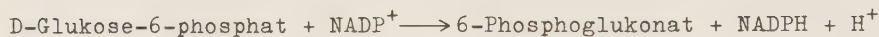
Das Prinzip des C-Peptid-Radioimmunoassays ist die kompetitive Bindung zwischen C-Peptid-J-125 und C-Peptid-Standard an einen C-Peptid-spezifischen Antikörper. Zur Trennung des freien vom antikörpergebundenen C-Peptid wird die Doppelantikörpermethode benutzt (37). Zur Bestimmung wird der Kit der Firma Byk-Mallinckrodt eingesetzt.

0,5ml Phosphat-Puffer und 0,1ml C-Peptidantiserum werden mit 0,2ml Patientenserum versetzt. Dazu gibt man 0,1ml C-Peptid-J-125. Nach leichtem Durchmischen werden die Röhrchen zwei Tage bei 4°C inkubiert.

Danach werden 0,1ml Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin in jedes Röhrchen gegeben, leicht durchgemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Röhrchen werden bei 2000 Upm 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe entfernt. Anschließend wird die Radioaktivität des Rückstandes im Gammastrahlenzähler gemessen und ausgewertet.

C.1.2 Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut

Nach dem Prinzip der enzymatischen Messung einer Substratkonzentration läßt sich Glukose in einer gekoppelten Reaktion bestimmen. In einer Hilfsreaktion wird Glukose durch Hexokinase phosphoryliert und das gebildete Glukose-6-phosphat in einer nachfolgenden Indikatorreaktion durch Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) dehydriert:



Die gebildete Menge NADPH, die aus der Extinktionszunahme bei 365nm errechnet wird, entspricht stöchiometrisch der umgesetzten Glukosemenge.

C.1.3 Bestimmung der Enteroglukagonkonzentration im Serum

Die Bestimmung erfolgt nach der in B.1.10 genannten Methode. Zur Bestimmung werden 0,2ml Serum eingesetzt.

C.1.4 Bestimmung der Insulinantikörper im Serum

0,1ml Serum, 0,2ml Albumin/Phosphat-Puffer und 0,1ml(=100pg) J-125-Insulin werden über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach werden 0,1ml Anti-Human JgG vom Kaninchen zugegeben, 5 Stunden inkubiert und das Gemisch zentrifugiert. Der Überstand wird mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, der Rückstand mit 1ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wird der Rückstand im Gammastrahlenzähler gemessen.
80-120 Impulse/min.=normal, 400-2000 Impulse/min.=pathologisch.

C.1.5 Bestimmung der Enteroglukagonkonzentration im Serum mit Glukagonantiserum K30

Verwendet wird ein Glukagon RIA - KIT von Serono (PEG-Technik), welcher als Antikörper das pankreasspezifische Antiserum K30 von Unger enthält.

Zuerst werden der Glukagonantikörper und die unbekannten Serumproben gemischt. Dabei verbindet sich der Glukagonantikörper mit dem zu messenden Glukagon in einem bestimmten Mengenverhältnis. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird J-125-Glukagon zu diesem Komplex hinzugegeben und inkubiert. Danach werden den Ansätzen ein Carrierserum (Rinder-Gamma-Globulin) und eine Polyäthylenglykollösung (PEG) hinzugegeben. Nach dem Zentrifugieren wird das im Überstand verbliebene freie Glukagon entfernt und die Radioaktivität des Rückstandes gemessen.

Durchführung der Bestimmung

0,1ml Patientenserum und 0,1ml Trasylol^R (1000 KIE) werden mit 0,1ml Glukagonantiserum versetzt. Nach gutem Mischen und 20 Stunden Inkubationszeit werden 0,1ml J-125-Glukagon zugefügt, gut gemischt und weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden in jedes Röhrchen 0,1ml Carrierserum und 1ml PEG-Lösung gegeben. Die Röhrchen werden bei 2000 Upm 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, der Rückstand mit 1ml aqua dest. versetzt und nochmals bei 2000 Upm 3 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird die Radioaktivität des Rückstandes im Gammastrahlenzähler gemessen und mittels mitgeführter Standardproben ausgewertet.

C.1.6 Ausführung der Belastungen mit Arginin und Glukose

Die Arginininfusion erfolgt mit Argininiummonochlorid in einer Konzentration von 50g/250ml (gelöst in physiologischer Kochsalzlösung).

500mg Arginin/kg Körpergewicht werden über eine Braunüle in eine Antecubitalvene gleichmäßig über 30 Minuten infundiert.

Die Glukosebelastung erfolgt mit 50g Glukose, oral.

C.1.7 Probennahme

Bei der Bestimmung von Enteroglukagon, C-Peptid und Glukose wird venöses Blut verwendet. Hämolytische Seren können falsche Werte ergeben. Es muß deshalb bei der Abnahme und beim Abseren Hämolyse vermieden werden.

Die Blutentnahme erfolgt über 2,5 Stunden (-15, 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 und 150 Minuten bei der Argininbelastung bzw. -15, 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten bei der oralen Glukosebelastung) aus einer Antecubitalvene.

Zur Enteroglukagonbestimmung werden 9,6ml Blut mit 0,4ml Trasylol^R (=800KIE/ml Blut) versetzt. Das Serum wird abzentrifugiert und bei -20°C im Tiefkühlschrank bis zur Bestimmung gelagert.

Zur Blutzuckerbestimmung wird das Blut sofort nach der Abnahme in Röhrchen, die EDTA enthalten, gegeben. 100µl des ungerinnbaren Blutes werden unmittelbar danach in 1ml Perchlorsäure/Perchlorat-Gemisch gegeben und nach der in C.1.2 genannten Methode weiterverarbeitet.

Für die Serum-C-Peptidbestimmungen wird das Blut ohne Zusätze abgenommen, abzentrifugiert und das Serum bei -20°C im Tiefkühlschrank bis zur Bestimmung gelagert.

C.1.8 Verfahren zum Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon mittels Verdünnungskurven und Antiserum AS 909

Mit Hilfe von Verdünnungskurven ist es möglich, die immunologischen Eigenschaften zweier Antigene miteinander zu vergleichen. Um die immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon miteinander zu vergleichen, werden dem Standardansatz statt Glukagon steigende Verdünnungen des Serums zugesetzt und die daraus resultierende Kurve mit der normalen Standardkurve verglichen. Bei identischen immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon müßten beide Kurven deckungsgleich sein.

Um den möglichen Einfluß von Gammaglobulinen auf die Antigen-Antikörper-Reaktion, wie er von Unger (38) beschrieben wurde, zu verhindern, wird das Enteroglukagon aus einem Serum mittels Äthanol extrahiert.

Durchführung der Bestimmung

Die Erstellung der Standardkurve erfolgt nach dem in B.1.8 genannten Verfahren.

Zur Extraktion des Enteroglukagons aus dem Serum werden 10ml Serum mit 18ml 96%igem Äthanol versetzt, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Anschließend wird der Extrakt mit Hilfe des Vakuumrotationsverdampfers bei Zimmertemperatur und 15-20 mmHg bis zur Trockenheit eingeengt. Der Rückstand wird in 6ml Veronalpuffer pH 8,6 aufgenommen.

Sowohl unbehandeltes Serum als auch extrahiertes Serum werden nun den Standardansätzen statt Glukagon zugesetzt. (0,05ml, 0,1ml, 0,2ml und 0,5ml). Nach den üblichen Inkubationsbedingungen und der Trennung mittels Amberlite G-400 (OH-Form) werden die erstellten Kurven mit den parallel angesetzten Standardkurven verglichen.

C.1.9 Verfahren zum Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon mittels Verdünnungskurven und Antiserum K30

Um die immunologischen Eigenschaften des Enteroglukagons bei Basalsekretion und nach maximaler Stimulation mit Glukose, oral, zu untersuchen, werden die 0-Minuten-Werte für die Basalsekretion und die 30-Minuten-Werte für die maximale Stimulation gepoolt.

Den Standardansätzen werden statt Glukagon steigende Verdünnungen der jeweiligen Seren zugesetzt und die daraus resultierenden Kurven mit den normalen Standardkurven verglichen.

Durchführung der Bestimmung

Die Erstellung der Standardkurven erfolgt nach dem unter C.1.5 genannten Verfahren.

Für die Verdünnungsreihen werden die gepoolten 0-Minuten-Seren bzw. 30-Minuten-Seren $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$ und $1/32$ verdünnt und 0,1ml dieser Verdünnungen den Standardansätzen statt Glukagon zugesetzt.

C.1.9.1 Gelchromatographie mit Sephadex G 50

Die Gelchromatographie wird auf einer Säule von 0,9cm Durchmesser und 60cm Länge mit Sephadex g 50 in 1M Essigsäure durchgeführt. Eingesetzt werden 0,7ml Serum nach Stimulation mit Glukose, oral. Gesammelt werden 40 Fraktionen von je 1,5ml, die mit $20\mu\text{l}$ Humanalbuminlösung 20% versetzt und lyophilisiert werden. Das Lyophilisat wird in 0,1ml Assay-Puffer gelöst und die IRG-Konzentration nach der unter C.1.5 genannten Methode bestimmt.

C.1.10 Patienten

Bei den Patienten handelt es sich um sechs Männer und eine Frau zwischen 34 und 47 Jahren, deren Operationen zum Zeitpunkt der Belastungen 1-4 Jahre zurücklagen.

Patient	Alter	Gewicht	Größe	OP-Intervall	I-Dosis	I-AK
F.H.♀	38J.	70kg	156cm	14 Mon.	28IE Depot	+
G.J.♂	47J.	55kg	168cm	20 Mon.	32IE Depot	+
L.P.♂	53J.	84kg	185cm	45 Mon.	40IE Komb	+
T.E.♂	44J.	82kg	184cm	48 Mon.	44IE CR	+
S.K.♂	37J.	75kg	170cm	32 Mon.	28IE Depot	+
W.D.♂	34J.	50kg	165cm	41 Mon.	44IE CR	+
S.M.♂	37J.	50kg	166cm	39 Mon.	24IE Depot	+

I-Dosis = Insulin-Dosis

I-AK = Insulin-Antikörper

Alle Patienten wurden totalduodenopankreatektomiert wegen chronisch rezidivierender Pankreatitiden.

Außer Pankreas und Duodenum wurden die Milz und die Gallenblase entfernt, ferner 2/3 des Magens nach Billroth II und eine Choledochointerostomie angelegt. Die diabetische Stoffwechsellage der Patienten wurde bisher mit Insulin zwischen 24IE und 44IE behandelt. Zur Substitution der Pankreasfermente erhielten die Patienten Pankreon^R.

Die Belastungen mit Arginin bzw. Glukose erfolgen morgens am nüchternen Patienten und nach 25 Stunden Insulinkarenz.

C.1.11 Auswertung

Da die Nüchternwerte der Blutzuckerspiegel, der Enteroglukagonspiegel und der C-Peptidspiegel der einzelnen Patienten sehr unterschiedlich sind, werden die -15-Minutenwerte und die 0-Minutenwerte zusammengefaßt, deren Mittelwert gleich 100% gesetzt und die nachfolgenden Werte in Prozent der Basalsekretion angegeben.

Es werden folgende mathematische Gleichungen benötigt:

für den Mittelwert $\bar{x}$

für die Standardabweichung SE

Die streuenden Einzelwerte $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ aus einer Versuchsreihe können zu einem Mittelwert $\bar{x}$ zusammengefaßt werden.

$$\bar{x} = \left(\sum_{i=1}^n \bar{x}_i \right) / n$$

wobei $i = 1, 2, 3, \dots, n$ ist.

Das quantitative Maß für die Unsicherheit dieses Mittelwertes ist die Varianz (Summe der Abweichungsquadrate dividiert durch $n-1$) oder die Standardabweichung SE.

$$SE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x = Einzelwert

n = Anzahl der Beobachtungen

$\bar{x}$ = Mittelwert

C.2 Ergebnisse

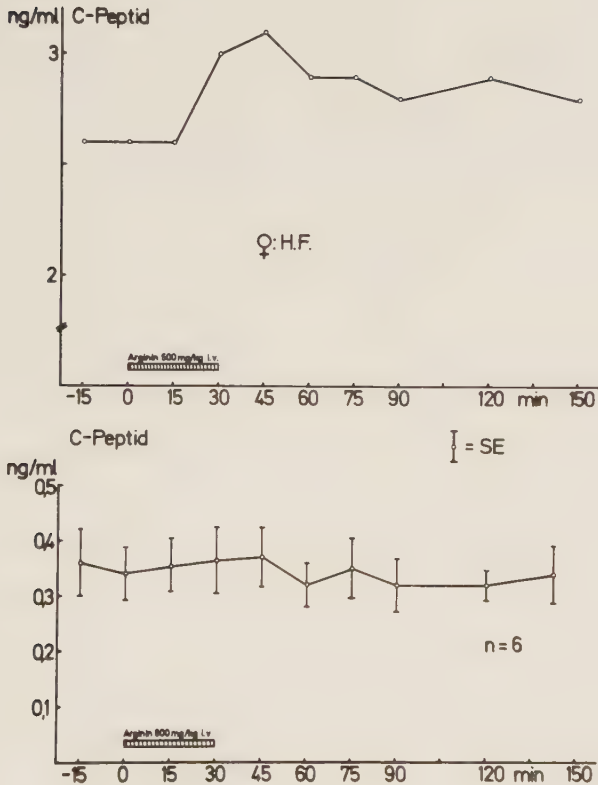


Abbildung 8: Serum-C-Peptidspiegel während einer intravenösen Argininbelastung bei 7 Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie

Abbildung 8 zeigt das Verhalten von Serum-C-Peptid während der intravenösen Argininbelastung. Bei sechs Patienten nach

totaler Duodenopankreatektomie ist keine Änderung der Serum-C-Peptidspiegel festzustellen, deren Werte nahe der Nachweisgrenze liegen.

Dagegen zeigen sich bei der Patientin H.F. normale Serum-C-Peptidspiegel von 2,6ng/ml. Nach 15 Minuten Arginininfusion steigen die Werte an und erreichen nach 45 Minuten die maximale Konzentration von 3,1ng/ml.

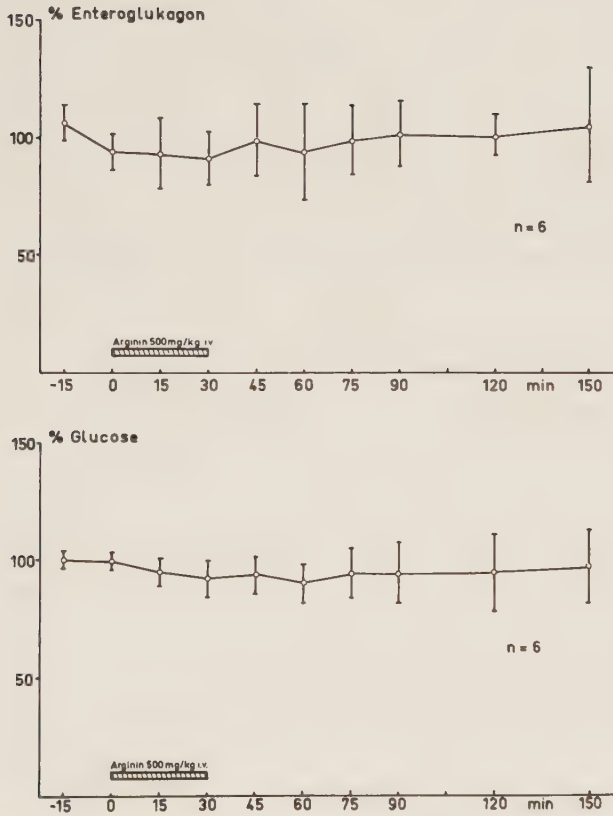


Abbildung 9: Enteroglukagon- und Blutzuckerverhalten bei 6 Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie während einer intravenösen Argininbelastung

Abbildung 9 zeigt das Verhalten von Enteroglukagon und Blutzucker während der Argininbelastung. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Basalsekretion, deren Werte

gleich 100% gesetzt wurden. Die Enteroglukagonnüchternspiegel liegen zwischen 170,5pg/ml und 496pg/ml und verändern sich unter der Arginininfusion nicht.

Hinsichtlich der Blutzuckernüchternspiegel unterscheiden sich die Patienten ganz erheblich. Mittelwerte aus den -15-Minuten-Werten und den 0-Minuten-Werten ergeben 90mg/dl, 177mg/dl, 204,5mg/dl, 297mg/dl, 312mg/dl und 343mg/dl.

Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, ist unter der Arginininfusion keine Veränderung der Blutzuckerspiegel festzustellen.

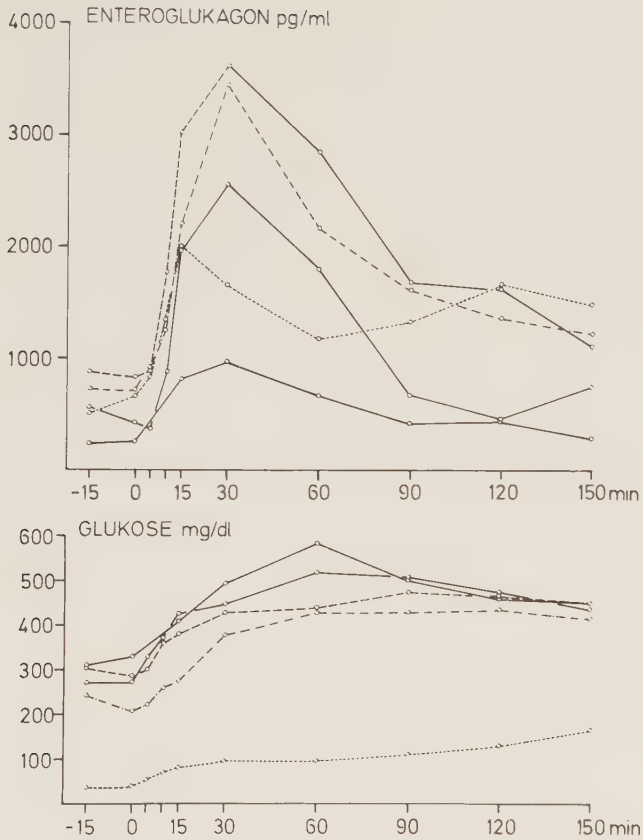


Abbildung 10: Enteroglukagon- und Blutzuckerverhalten bei 5 Patienten nach totaler Duodenopancreatektomie während einer oralen Glukosebelastung

Abbildung 10 zeigt das Verhalten von Enteroglukagon und Blutzucker während der oralen Glukosebelastung.

Bei allen Patienten ist ein steiler Anstieg der Enteroglukagonwerte innerhalb der ersten 15 Minuten zu verzeichnen. Die maximale Konzentration an Enteroglukagon wird nach 30 Minuten erreicht.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, sind auch hier wieder die Blutzuckernüchternspiegel sehr unterschiedlich, bedingt durch die diabetische Stoffwechsellage der Patienten. Die Mittelwerte liegen bei 39mg/dl, 224,5mg/dl, 271mg/dl, 295,5mg/dl und 319mg/dl. Die maximalen Blutzuckerkonzentrationen werden nach 60 bis 90 Minuten erreicht, wenn die Enteroglukagonspiegel bereits wieder abgefallen sind. Auffallend ist, daß ein Patient mit einem sehr viel niedrigeren Blutzuckernüchternspiegel (39mg/dl) als die anderen Patienten innerhalb der ersten 15 Minuten einen ebenso raschen Anstieg der Enteroglukagonsekretion aufweist, wie die anderen Patienten.

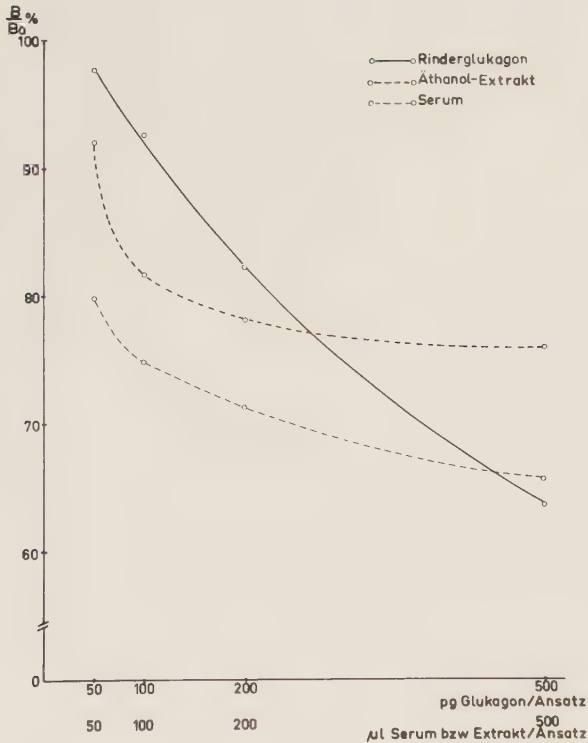


Abbildung 11: Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon im Serum zweier totalduodenopankreatektomierter Patienten mittels Verdünnungskurven

Es ergeben sich deutliche Unterschiede im immunologischen Verhalten von Glukagon und Enteroglukagon. Dabei zeigt sich, daß der Verlauf der beiden Kurven, die das Enteroglukagon repräsentieren, nahezu parallel ist.

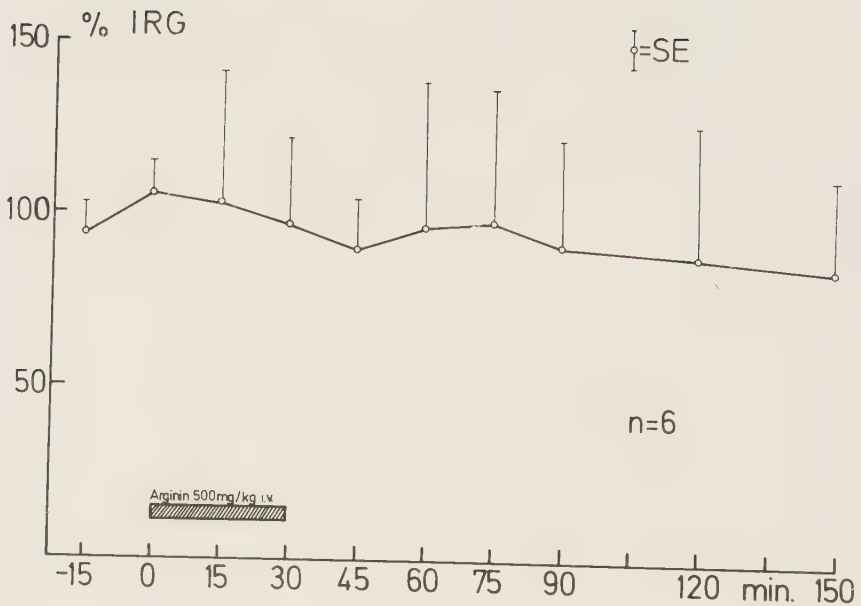


Abbildung 12:

Enteroglukagonverhalten bei sechs Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie während einer intravenösen Argininbelastung, gemessen mit Antiserum K 30

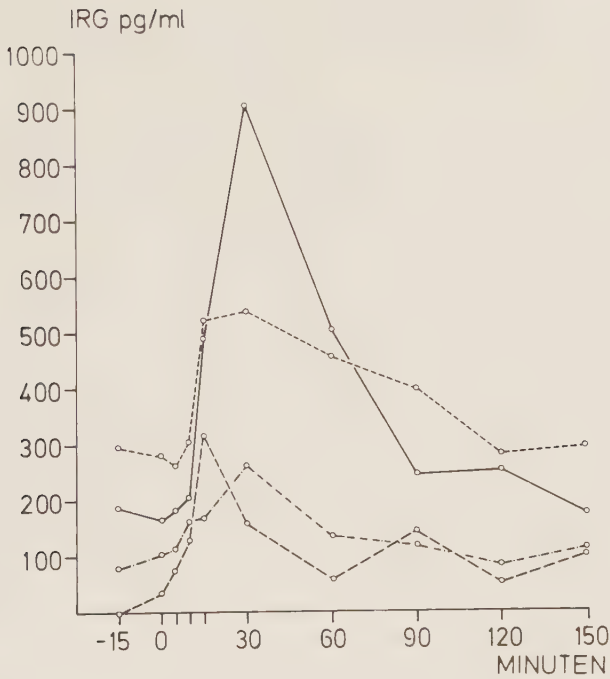


Abbildung 13:

Enteroglukagonverhalten bei vier Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie während einer oralen Glukosebelastung, gemessen mit Antiserum K 30

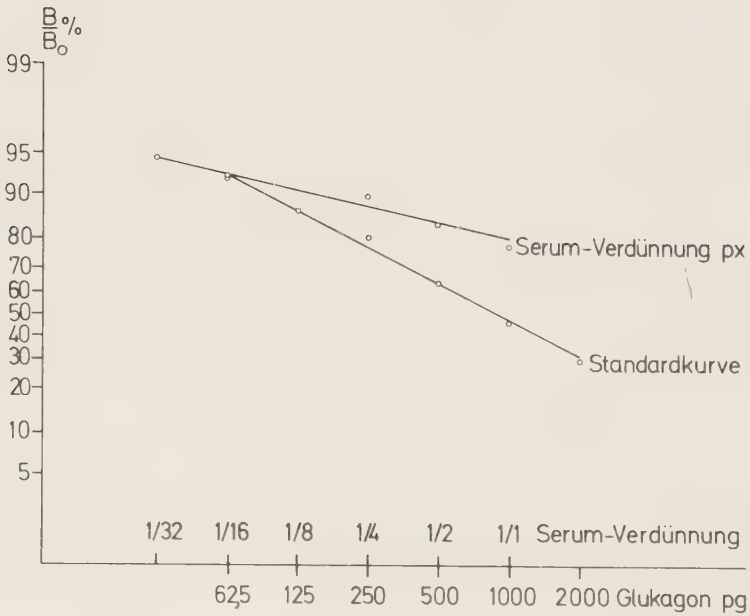


Abbildung 14:

Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon bei Basalsekretion mittels Verdünnungskurven und Antiserum K 30

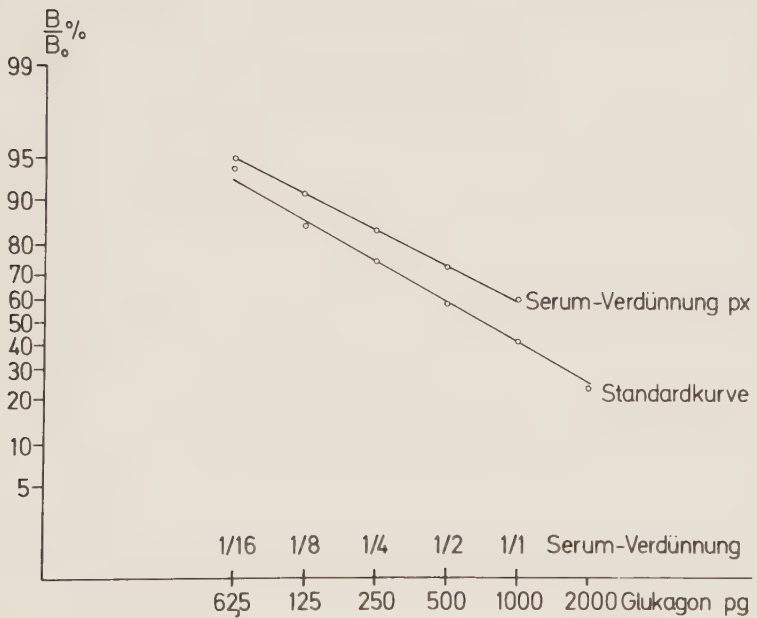


Abbildung 15:

Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon nach Stimulation mit Glukose, oral, mittels Verdünnungskurven und Antiserum K 30

Abbildung 12 zeigt das Verhalten von Enteroglukagon während der intravenösen Argininbelastung, gemessen mit Antiserum K 30. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Basalsekretion, deren Werte gleich 100% gesetzt wurden. Die Enteroglukagonnüchternspiegel liegen zwischen 44pg/ml und 364pg/ml und verändern sich unter der intravenösen Argininbelastung nicht.

Abbildung 13 zeigt das Verhalten von Enteroglukagon während der oralen Glukosebelastung, gemessen mit Antiserum K 30. Auch hier ist bei allen vier Patienten ein steiler Anstieg der Enteroglukagonwerte innerhalb der ersten 15 Minuten zu verzeichnen. Die maximale Konzentration an Enteroglukagon wird wieder nach 30 Minuten erreicht.

Abbildung 14 zeigt die immunologischen Eigenschaften von Enteroglukagon bei Basalsekretion, gemessen mit dem Antiserum K 30.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist der Verdrängungseffekt von Enteroglukagon wesentlich geringer, als der von pankreatischem Glukagon, erkenntlich am flacheren Verlauf der Serumverdünnungskurve. Während bei einer Glukagonkonzentration von 62,5pg/ml bzw. einer Serumverdünnung von 1/16 die antikörpergebundene Radioaktivität nahezu gleich ist (92,1% bzw. 92,2%), ist der Verdrängungseffekt bei 1000pg Glukagon wesentlich größer, als der von Enteroglukagon bei einer Konzentration von 1/1 (44,9% bzw. 76,8%). Da die Auftragung der Konzentrationen im logarithmischen Maßstab erfolgt, können beide Konzentrationsangaben (pg bzw. Verdünnungsgrad) in Beziehung gesetzt werden.

Abbildung 15 zeigt die immunologischen Eigenschaften von Enteroglukagon bei maximaler Stimulation mit Glukose, oral. Dabei zeigt sich, daß der Verdrängungseffekt von Enteroglukagon ebenso groß ist, wie der von pankreatischem Glukagon, erkenntlich am parallelen Verlauf der Serumverdünnungskurve und der Standardkurve.

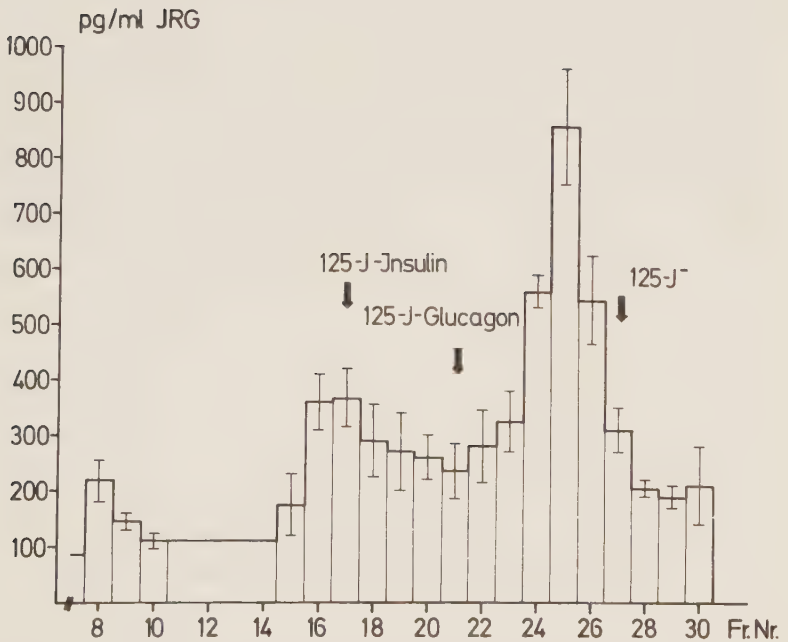


Abbildung 16: IRG-Gehalt der einzelnen Fraktionen der Seren nach maximaler Stimulation von vier Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie. Gelchromatographie mit Sephadex G 50 in 1M Essigsäure.

Abbildung 16 zeigt den IRG-Gehalt der einzelnen Fraktionen. Die Eichung der Säule erfolgte mit J-125-Insulin, J-125-

Glukagon und J⁻-125, um zu demonstrieren, in welcher Fraktion diese Proteine erscheinen.

Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, ergeben sich drei immunreaktive peaks. Der erste in einem Molekulargewichtsbereich von größer als 30000, der zweite im Molekulargewichtsbereich von Insulin und der dritte im Molekulargewichtsbereich von 2000.

Fraktion Nummer 21, in der pankreatisches Glukagon mit einem Molekulargewicht von 3500 erscheint, weist kein Maximum auf. Allerdings beträgt der mittlere IRG-Gehalt 235pg/ml, so daß nicht sicher entschieden werden kann, ob diese Fraktionen Glukagon enthalten.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Valverde et al.(14) an pankreatektomierten Hunden überein, außer dem 3500 Molekulargewichts-Peak, wie er im Serum von pankreatektomierten Hunden mittels Gelchromatographie nachzuweisen ist.

C.3 Diskussion

Um das Sekretionsverhalten von Enteroglukagon studieren zu können, ist der Nachweis der totalen Duodenopankreatektomie von entscheidender Bedeutung.

Aus bisher veröffentlichten Arbeiten geht dies nicht hervor. Wie bei einem Patienten gezeigt werden konnte, können auch nach totaler Duodenopankreatektomie noch Reste sekretorisch aktiven Pankreasgewebes vorhanden sein, die u.U. noch pankreatisches Glukagon sezernieren können.

Vranic et al. (39) wiesen beim Hund die vollständige Pankreasresektion durch den Experimenten folgende Autopsie und makroskopische und mikroskopische Untersuchungen nach, um Reste pankreatischen Gewebes auszuschließen.

Auch die Bestimmung der Insulinspiegel im Serum nach 25 Stunden Insulinkarenz ist problematisch, da alle Patienten durch die exogene Insulinsubstitution im Laufe der Zeit Insulinantikörper bildeten, die bei der Insulinbestimmung zu falschen und nicht verwertbaren Werten führen. Die Bestimmung der Serum-C-Peptidspiegel unter der Arginininfusion ist daher z.Z. die beste Methode, um die Anwesenheit noch sekretorisch aktiven Pankreasgewebes auszuschließen. Dadurch kann gesichert werden, daß kein pankreatisches Glukagon in die Enteroglukagonmeßwerte eingeht.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß beim Menschen nach totaler Duodenopankreatektomie keine arginininduzierte Enteroglukagonsekretion stattfindet. Zu gleichen Ergebnissen kamen Müller et al. (40), die eine Arginininfusion bei zwei Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie durchführten. Für ihre Messungen benutzten sie ebenfalls ein Antiserum, welches hochspezifisch für pankreatisches Glukagon ist (K30).

Das läßt die Vermutung zu, daß im Intestinaltrakt beim Menschen keine nennenswerte Anzahl funktionell den pankreatischen A-Zellen gleiche Zellen existiert. Diese Annahme stützt sich auf die Tatsache, daß die Sekretion von normalen A-Zellen durch Arginin stimuliert werden kann. Da bei den Patienten das Duodenum ebenfalls entfernt wurde, muß offenbleiben, ob das Duodenum funktionell den pankreatischen A-Zellen gleiche Zellen enthält.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen, die Vranic et al. (13) an pankreatektomierten Hunden fanden. Arginin erzeugte bei pankreatektomierten Hunden eine Erhöhung des IRG-Plasmaspiegels und der Glukoseproduktion, wenn den Hunden akut Insulin entzogen wurde. Vier Antiseren, jedes hochspezifisch für pankreatisches Glukagon, ergaben Verdünnungskurven, die mit denen des pankreatischen Glukagons identisch waren.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die von Vranic beim Hund gefundenen Verhältnisse nicht auf den Menschen übertragen lassen.

Samols et al. (12) zeigten eine Erhöhung der Enteroglukagonspiegel nach oraler Gabe von Glukose. Sie vermuteten, daß durch die Enteroglukagonsekretion die Aufnahme von Glukose in die Leber gehemmt wird und die periphere Utilisation von Glukose während der vermehrten Insulinsekretion erhöht wird.

Bei der oralen Glukosebelastung bei Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie zeigt sich, daß die Geschwindigkeit der Enteroglukagonsekretion bei allen Patienten in den ersten 15 Minuten gleich ist, trotz der sehr unterschiedlichen Blutzuckernüchternspiegel. Der Mechanismus zur

Freisetzung des Enteroglukagons scheint vom aktuellen Blutzuckerwert unabhängig zu sein. Darauf weist besonders das Sekretionsverhalten des Enteroglukagons eines Patienten mit einem Malabsorptionssyndrom hin, der in den ersten 15 Minuten einen ebenso raschen Anstieg an Enteroglukagon aufweist, wie die anderen Patienten, obwohl sich die Resorption der Glukose über einen weitaus größeren Zeitraum erstreckt. Das spricht dafür, daß für die Sekretion des Enteroglukagons nur der Kontakt der Glukose mit der Darmschleimhaut wichtig zu sein scheint und im weiteren Verlauf bei zunehmend höheren Blutzuckerspiegel nicht weiter beeinflußt wird.

Der steile Anstieg der Enteroglukagonspiegel nach der oralen Glukosebelastung liegt wahrscheinlich in der akuten Erhöhung der Glukosekonzentration im Darm durch schnelle Magenentleerung, da bei den Patienten $2/3$ des distalen Magens entfernt wurden. Dieser Effekt ist auch bei Patienten nach Gastrektomie beobachtet worden (41, 42).

Beim Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon im Serum zweier totalduodenopankreatektomierter Patienten mit dem Antiserum AS 909 zeigen sich deutliche Unterschiede. Der Unterschied in der antikörpergebundenen Radioaktivität ist bedingt durch die verschiedenen Enteroglukagonkonzentrationen der beiden Seren.

Der Anstieg von IRG während der oralen Glukosebelastung beweist die Existenz eines extrapankreatischen Glukagons beim Menschen. Allerdings ist der Regulationsmechanismus zur Sekretion von extrapankreatischem Glukagon anders, als der von pankreatischem Glukagon aus der A-Zelle.

Glukose, oral, stimuliert die Sekretion von extrapankreatischem Glukagon, während Arginininfusion auf die Sekretion von extrapankreatischem Glukagon keinen Einfluß hat. Bei pankreatischem Glukagon verhält es sich umgekehrt: Suppression der Sekretion von pankreatischem Glukagon während der oralen Glukosebelastung (20) und Anstieg der Sekretion während der intravenösen Argininbelastung.

Der nicht parallele Verlauf der Standardkurve und der Serumverdünnungskurve unter Basalsekretion, gemessen mit dem pankreasspezifischen Antiserum K30, deutet darauf hin, daß sich das unter nicht stimulierten Bedingungen sezernierte Enteroglukagon immunologisch von pankreatischem Glukagon unterscheidet. Die Serumverdünnungskurve nach Stimulation demonstriert die immunologische Identität des sezernierten Materials mit dem in der Standardkurve verwendeten pankreatischen Glukagon. Das unter Stimulation sezernierte Material enthält also zu einem hohen Grad IRG.

Mittels Gelchromatographie mit Sephadex G 50 lassen sich im Serum nach Stimulation drei immunreaktive peaks nachweisen. Der erste in einem Molekulargewichtsbereich von größer als 30000, der zweite im Molekulargewichtsbereich von Insulin und der dritte im Molekulargewichtsbereich von 2000.

Villanueva et al. (43) konnten an einem Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie keine Stimulation von IRG nach Belastung mit Glukose, oral, nachweisen. Allerdings wurde nicht der Nachweis der totalen Duodenopankreatektomie erbracht. Es wäre denkbar, daß eine geringe Restfunktion von pankreatischen B-Zellen die Sekretion von IRG supprimiert.

Umgekehrt könnten steigende IRG-Spiegel bei insulinpflichtigen Diabetikern zu unstabiler Stoffwechsellage und hohen Blutzuckerspiegeln führen. Diese Vermutung wird gestützt von anderen Autoren, wonach die Stoffwechsellage bei Diabetikern mit einer Restfunktion von B-Zellen stabiler ist, als die bei Diabetikern ohne B-Zellen-Aktivität. (44, 45)

C.4 Zusammenfassung

Durch Serum-C-Peptidbestimmungen konnte bei sechs Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie die Vollständigkeit der Pankreasresektion gesichert und somit die Anwesenheit pankreatischen Glukagons ausgeschlossen werden.

Bei sechs Patienten nach gesicherter totaler Duodenopankreatektomie wurde eine intravenöse Argininbelastung durchgeführt und kein Anstieg der Enteroglukagonspiegel, gemessen mit Antiserum AS 909 und Antiserum K30, bzw. der Blutzuckerspiegel beobachtet. Während der oralen Glukosebelastung bei fünf Patienten nach gesicherter totaler Duodenopankreatektomie war ein steiler Anstieg der Enteroglukagonsekretion bei allen Patienten in den ersten 15 Minuten zu beobachten, trotz sehr unterschiedlicher Blutzuckernüchternspiegel. Die Enteroglukagonspiegel wurden mit den Antiseren AS 909 und K30 gemessen.

Immunologische Vergleiche pankreatischen Glukagons mit Enteroglukagon mittels Verdünnungskurven ergaben unter Basalsekretion deutliche Unterschiede. Unter Stimulation mit Glukose, oral, waren Enteroglukagon und pankreatisches Glukagon immunologisch nicht zu unterscheiden.

Diese Befunde erlauben folgende Aussagen:

1. Beim Menschen existiert im Intestinaltrakt keine nennenswerte Anzahl von Zellen, die den pankreatischen A-Zellen funktionell gleich sind.
Für das Duodenum kann keine Aussage getroffen werden.
2. Die von Vranic beim Hund gefundenen Verhältnisse lassen sich nicht auf den Menschen übertragen.

3. Der Mechanismus zur Freisetzung von Enteroglukagon scheint vom aktuellen Blutzuckerwert unabhängig zu sein. Für die Sekretion des Enteroglukagons scheint nur der Kontakt der Glukose mit der Darmschleimhaut wichtig zu sein.
4. Pankreatisches Glukagon und extrapankreatisches Glukagon unterscheiden sich immunologisch beim Menschen unter Basalsekretion.
Unter Stimulation sind pankreatisches und extrapankreatisches Glukagon immunologisch beim Menschen identisch.

C.5 Anhang

Tabellen

1. Serum-C-Peptidspiegel während einer intravenösen Argininbelastung bei sieben Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie.

Zeit in Min.	ng C-Peptid/ml Serum						
	F.H.	G.J.	L.P.	T.E.	S.K.	W.D.	S.M.
-15	2,6	0,3	0,33	0,4	0,44	0,3	0,4
				$\bar{x}=0,36$	SE=0,06		
0	2,6	0,4	0,32	0,3	0,39	0,3	0,3
				$\bar{x}=0,34$	SE=0,048		
15	2,6	0,3	0,34	0,4	0,39	0,4	0,3
				$\bar{x}=0,36$	SE=0,05		
30	3,0	0,3	0,34	0,4	0,45	0,4	0,3
				$\bar{x}=0,365$	SE=0,06		
45	3,1	0,4	0,41	0,4	0,4	0,3	0,3
				$\bar{x}=0,37$	SE=0,053		
60	2,9	0,3	0,33	0,3	0,4	0,3	0,3
				$\bar{x}=0,32$	SE=0,04		
75	2,9	0,4	0,41	0,3	0,38	0,3	0,3
				$\bar{x}=0,35$	SE=0,054		
90	2,8	0,3	0,28	0,3	0,36	0,3	0,4
				$\bar{x}=0,32$	SE=0,047		
120	2,9	0,3	0,36	0,3	0,35	0,3	0,3
				$\bar{x}=0,32$	SE=0,028		
145	2,8	0,4	0,29	0,3	0,36	0,3	0,3
				$\bar{x}=0,33$	SE=0,052		

Blutzuckerverhalten bei sechs Patienten nach totaler Duodenopancreatektomie während der Argininbelastung

Zeit in Min.	S.K. mg/dl %	S.M. mg/dl %	G.J. mg/dl %	L.P. mg/dl %	T.E. mg/dl %	W.D. mg/dl %	$\bar{x}$ %	SE
-15	288 96,7 297 100,0 306 103,0	96 106,7 90 100,0 84 93,3	200 97,8 204,5 209 102,2	173 97,7 177 100,0 181 102,2	353 102,9 343 100,0 333 97,1	312 100 312 100 312 100	100,3 99,6	3,8 3,8
15	291 97,8	76 84,4	203 99,3	161 91,0	338 98,5	304 97,4	94,7	5,9
30	310 104,4	74 82,2	195 95,4	155 87,6	298 86,9	293 93,9	91,7	7,9
45	307 103,4	73 81,1	196 95,8	172 97,2	299 87,2	298 95,5	93,3	7,9
60	280 94,3	71 78,9	197 96,3	159 89,8	278 81,1	305 97,8	89,7	8,0
75	315 106,1	72 80,0	196 95,8	177 100,0	283 82,5	317 101,6	94,3	10,7
90	312 105,4	68 75,6	195 95,4	182 102,8	277 80,8	328 105,1	94,2	13,0
120	320 107,7	65 72,2	189 92,4	205 115,8	274 79,9	314 100,6	94,8	16,6
145	296 99,7	71 78,9	196 95,8	214 120,9	280 81,6	328 105,1	97,0	15,6

Enteroglukagonverhalten von sechs Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie während der Argininbelastung

Zeit in Min.	S.K.		S.M.		G.J.		L.P.		T.E.		W.D.		$\bar{x}$		SE
	pg/ml	%	pg/ml	%	pg/ml	%	pg/ml	%	pg/ml	%	pg/ml	%	%	%	
-15	493	99,4	331	94,0	191	112,0	237	108,5	288	113,4	388	110,7	106,3		7,8
	496	100,0	352	100,0	170,5	100,0	218,5	100,0	254	100,0	350,5	100,0			
0	499	100,6	373	106,0	150	88,0	200	91,5	220	86,6	313	89,3	93,7		7,8
15	516	104,0	385	109,4	155	90,9	228	104,3	196	77,2	258	73,6	93,2		15,1
30	393	79,2	384	109,1	150	88,0	176	80,5	235	92,5	343	97,9	91,2		11,3
45	512	103,2	405	115,1	160	93,8	222	101,6	181	71,3	384	109,6	99,1		15,4
60	526	106,0	450	127,8	121	71,0	176	80,5	241	94,9	289	82,5	93,8		20,6
75	483	97,4	392	111,4	156	91,5	165	75,5	264	103,9	405	115,5	99,2		14,6
90	491	99,0	355	100,9	202	118,5	256	117,2	215	84,6	320	91,3	101,9		13,6
120	516	104,0	349	99,1	197	115,5	231	105,7	232	91,3	332	94,7	101,7		8,7
150	435	87,7	386	109,7	232	136,1	295	135,0	232	91,3	276	78,7	106,4		24,7

4. Enteroglukagon- und Blutzuckerverhalten bei fünf Patienten nach totaler Duodenopancreatektomie während der oralen Glukosebelastung

Zeit in Min.	Glukose mg/dl					Enteroglukagon pg/ml				
	G.J.	L.P.	T.E.	S.K.	S.M.	G.J.	L.P.	T.E.	S.K.	S.M.
-15	270	303	242	310	38	571	888	739	235	520
0	272	288	207	328	40	424	839	736	249	672
15	328	301	222		54	368	898	927		837
10	372	360	259		71	888	1789	1260		1352
15	427	378	274	410	78	1964	3040	2212	815	1999
30	447	427	378	496	96	2570	3642	3459	978	1664
60	520	441	427	588	96	1799	2864	2182	675	1190
90	510	474	428	500	110	684	1685	1618	416	1335
120	475	464	434	460	128	459	1643	1380	424	1685
150	434	449	414	451	164	753	1112	1231	288	1511

5. Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon im Serum zweier totalduodenopankreatektomierter Patienten mittels Verdünnungskurven

Glukagon in ng bzw. Serum u. Extrakt in ml	B/B ₀ %		
	Standardkurve	Serum	Extrakt
0,05	97,6	79,8	93,1
0,1	92,6	74,9	81,7
0,2	82,4	71,4	78,1
0,5	63,7	65,6	74,6

6. Enteroglukagonverhalten bei vier Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie während einer oralen Glukosebelastung, gemessen mit Antiserum K30

Zeit in Min.	IRG pg/ml			
	S.M.	G.J.	T.E.	L.P.
-15	0	294	187	81
0	37	281	166	104
5	76	261	181	113
10	129	305	206	163
15	317	524	488	170
30	159	538	957	262
60	60	456	506	136
90	146	399	247	117
120	52	281	251	83
150	101	295	172	115

• Enteroglukagonverhalten (IRG) bei sechs Patienten nach totaler Duodenopancreatektomie während einer intravenösen Argininbelastung, gemessen mit Antiserum K30

Zeit in Min.	S.K. pg/ml	S.M. pg/ml	G.J. pg/ml	L.P. pg/ml	T.E. pg/ml	W.D. pg/ml	$\bar{x}$ %	SE
-15	35 79,5 44 100,0 53 120,5	53 94,6 56 100,0 59 105,4	327 89,8 364 100,0 401 110,2	149 106,8 139 100,0 130 93,2	188 98,2 191 100,0 195 101,8	68 95,1 74 100,0 75 104,9	94,0 106,0	9,1 9,1
15	45 102,2	91 162,5	309 84,9	98 70,3	120 62,7	96 134,3	102,8	38,8
30	33 75,0	62 110,8	334 91,8	109 78,1	160 83,6	101 141,3	96,8	25,3
45	31 70,5	46 82,1	344 94,5	120 86,0	171 89,3	82 114,7	89,5	14,8
60	26 59,1	100 178,6	352 96,7	113 81,0	144 75,2	63 88,1	96,5	42,2
75	35 79,5	96 171,4	394 108,2	87 62,4	155 80,9	60 83,9	97,7	39,0
90	24 54,5	82 146,4	299 82,1	145 103,9	158 82,5	53 74,1	90,6	31,6
120	19 43,2	37 66,1	351 96,4	118 84,6	164 85,6	110 153,8	88,3	37,2
150	20 45,5	35 62,5	405 111,3	138 98,9	210 109,7	53 74,1	83,7	27,1

8. Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon bei Basalsekretion mittels Verdünnungskurven und Antiserum K30

Glukagon in pg	B/B ₀ %	Serum-Verdünnung	B/B ₀ %
	Standardkurve		Verdünnungskurve
62,5	92,1	1/1	76,8
125	86,5	1/2	83,5
250	80,1	1/4	89,6
500	62,5	1/16	92,2
1000	44,9	1/32	94,5
2000	29,3		

9. Vergleich der immunologischen Eigenschaften von Glukagon und Enteroglukagon nach Stimulation mit Glukose, oral, mittels Verdünnungskurven und Antiserum K30

Glukagon in pg	B/B ₀ %	Serum-Verdünnung	B/B ₀ %
	Standardkurve		Verdünnungskurve
62,5	94,0	1/1	60,0
125	85,0	1/2	73,0
250	75,0	1/4	84,0
500	58,0	1/8	91,0
1000	41,0	1/16	95,0
2000	23,0		

10. IRG-Gehalt der einzelnen Fraktionen der Seren nach maximaler Stimulation von vier Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie. Gelchromatographie mit Sephadex G 50 in 1M Essigsäure.

Fraktion Nr.	pg IRG/ml					
	S.M.	G.J.	T.E.	L.P.	$\bar{x}$	SEM
8		175	193	284	217	33,7
9	158	114	178	126	144	14,7
10	143	102	84	111	110	12,3
15	84		158	277	173	56,2
16	493	277	291	376	359	49,7
17	287	508	287	368	363	52,1
18	178	481	256	240	289	66,3
19	211	473	221	166	268	69,5
20	211	270	360	193	259	37,6
21	114	246	345	233	235	47,3
22	132	221	428	331	278	64,5
23	202	267	457	379	326	56,9
24	489	556	540	640	556	31,2
25	796	825	1164	657	861	107,6
26	524	777	429	453	546	79,7
27	284	422	221	327	314	42,2
28	172	208	237	202	205	13,3
29	175	208	233	132	187	21,8
30	87	205	402	137	208	69,1

C.6 Literaturverzeichnis

- 1 Müller, W.A.
Enteroglukagon
Helv. med. Acta 37, 321-330 (1974)
- 2 Sutherland, E.W. and De Duve, C.
Origin and distribution of the hyperglycemic-
glycogenolytic factor of the pancreas
J. Biol. Chem. 175, 663-674 (1948)
- 3 Makman, M.H. and Sutherland, E.W. jr.
Use of liver adenyl cyclase for assay of glucagon
in human gastro-intestinal tract and pancreas
Endocrinology 75, 127-134 (1964)
- 4 Samols, E., Tyler, J., Megyesi, C., and Marks, V.
Immunochemical glucagon in human pancreas, gut
and plasma
Lancet 2, 727-729 (1966)
- 5 Unger, R.H., Ketterer, H. and Eisentraut, A.M.
Distribution of immunoassayable glucagon in
gastro-intestinal tissues
Metabolism 15, 865-867 (1966)
- 6 Assan, R., Tchobroutsky, G., Rosselin, G.
Caracterisation radio-immunologique de glucagon
dans les tissus digestifs de diverses especes animales
Path. Biol. 17, 747-755 (1969)
- 7 Orci, L., Pictet, R., Forssmann, W.G., Renold, A.E.,
and Rouiller, C.
Structural evidence for glucagon producing cells in
the intestinal mucosa of the rat
Diabetologia 4, 56-58 (1968)
- 8 Polak, J.M., Bloom, S., Coulling, I.
Immunofluorescent localization of enteroglucagon
cells in the gastrointestinal tract of the dog
Gut 12, 311-318 (1971)

- 9 Valverde, I., Rigopoulou, D., Marco, J., Faloona, G.R., Unger, R.H.
Molecular size of extractable glucagon and glucagon-like immunoreactivity GLI in plasma
Diabetes 19, 624-629 (1970)
- 10 Moody, A.J., Markussen, J., Schaich Fries, A., Steenstrup, C., Sundby, F., Malaisse, W., Malaisse-Lagae, F.
The insulin releasing activities of extracts of pork intestine
Diabetologia 6, 135-140 (1970)
- 11 Moody, A.J., Heding, L.G., Markussen, J. et al:
Origin, Chemistry, Physiology and Pathophysiology of the GI Hormones. Edited by W. Creutzfeldt, FK Schattauer Verlag, Stuttgart, p 185 (1970)
- 12 Samols, E., Tyler, J., Marri, G., Marks, V.
Stimulation of glucagon secretion by oral glucose
Lancet 2, 1257-1259 (1965)
- 13 Vranic, M., Pek, S., Kawamori, R., Cherrington, A.D., Yip, C., Morita, S., Ross, G., Lickley, L.
Das gastrointestinale Glukagon
IV. internationales Donausymposium über Diabetes mellitus
Dubrovnik (1975) abstract
- 14 Valverde, I., Dobbs, R., Unger, R.H.
Heterogeneity of plasma glucagon immunoreactivity in normal, depancreatized and alloxan-diabetic dogs
Metabolism 24, 1021-1028 (1975)
- 15 Kenny, A.J., Say, R.R.
Glucagon-like activity extractable from the gastrointestinal tract of man and other animals
J. Endocrin. 25, 1-7 (1962)
- 16 Lefebvre, P.J., Unger, R.H.
Glucagon: Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications
Elmsford, NY, Pergamon, (1972) S.324

- 17 Marco, J., Faloona, G.R., Unger, R.H.
Effekt of endogenous intestinal glucagon-like immunoreactivity GII on insulin secretion and glucose concentration in dogs
J. clin. Endocr. 33, 318-325 (1971)
- 18 Ohneda, A., Horigome, K., Kai, Y., Itabashi, H., Ishii, S., Yamagata, S.
Purification of canine gut glucagon-like immunoreactivity GII and its insulin releasing activity
Horm. Metab. Res. 8, 170-174 (1976)
- 19 Lefebvre, P.J., Unger, R.H., Valverde, I., Rigopoulou, D., Luyckx, A.S., Eisentraut, A.
Effekt of dog jejunum glucagon-like immunoreactivity material on adipose tissue metabolism
Horm. Metab. Res. 1, 143-144 (1969)
- 20 Heding, L.G.
Glucagon antibodies for the radioimmunoassay of pancreatic and gut glucagon
Abstracts, European Association for the Study of Diabetes, 5th annual meeting, Montpellier, France (1969)
- 21 Heding, L.G.
Radioimmunological determination of pancreatic and gut glucagon in plasma
Diabetologia 7, 10-19 (1971)
- 22 Yalow, R.S., Berson, S.A.
Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods
Nature 184, 1648 (1959)
- 23 Raith, L.
Einführung in radioimmunologische Methoden
Herausgegeben von Byk-Mallinckrodt Radiopharmazeutika-Diagnostika (1975) S. 21
- 24 Greenwood, F.C., Hunter, W.M.
The preparation of J-131-labelled human growth hormone of high specific radioactivity
Biochem. J. 89, 114-123 (1963)

- 25 Eisentraut, A.M., Whissen, N., Unger, R.H.
Incubation damage in the radioimmunoassay for human
plasma glucagon and its prevention with Trasylol
Amer. J. Med. Sci. 225, 137-142 (1968)
- 26 Mirsky, A., Perisutti, G., Davis, M.C.
The destruction of glucagon by the blood plasma
from various species
Endocrinology 64, 992-1001 (1959)
- 27 Lefebvre, P.J., Unger, R.H.
Glucagon: Molekular Physiology, Clinical and
Therapeutic Implications
Elmsford, NY, Pergamon, (1972) S.55
- 28 Unger, R.H., Eisentraut, A.M., McCall, M.S., Madison, L.L.
Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon
J. clin. Invest. 40, 1280-1289 (1961)
- 29 Unger, R.H., Eisentraut, A.M., Madison, L.L.
The effects of total starvation upon the levels of
circulating glucagon and insulin in man
J. clin. Invest. 42, 1031-1039 (1963)
- 30 Hazzard, W.R., Crockford, P.M., Buchanan, K.D.,
Vance, J.E., Chen, R., Williams, R.H.
A double antibody immunoassay for glucagon
Diabetes 17, 179-186 (1968)
- 31 Nonaka, K., Foa, P.P.
A simplified glucagon immunoassay and its use in
a study of incubated pancreatic islets
Proc. Soc. Exp. Biol. NY 130, 330-336 (1969)
- 32 Weinges, K.F.
Glukagon
Herausgegeben von Weitzel, G. und Zöllner, N,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968) S.92
- 33 Leclercq-Meyer, V., Mialhe, P., Malaisse, W.J.
Une Méthode de Dosage Radioimmunologique du Glucagon
comportant une Séparation par le Charbon-Dextran
Diabetologia 6, 121-129 (1970)

- 34 Raith, L.
Einführung in radioimmunologische Methoden
Herausgegeben von Byk-Mallinckrodt Radio-
pharmazeutika Diagnostika (1975) S.20
- 35 Lefebvre, P., Unger, R.H.
Glucagon: Molecular Physiology, Clinical
and Therapeutic Implications
Elmsford, NY, Pergamon, (1972) S.195
- 36 Rubenstein, A.H., Block, M.B., Starr, J.,
Melani, F., Steiner, D.F.
Proinsulin and C-Peptide in blood
Diabetes 21, Suppl. 2, 661 (1972)
- 37 Kaneko, T., Oka, H., Munemura, M., Oda, T.,
Yamashita, K., Suzuki, S., Yanaihara, N.,
Hashimoto, T., Yanaihara, C.
Radioimmunoassay of human C-Peptide using
synthetic human connecting peptide
Endocrinol. Jpn. 21, 141 (1974)
- 38 Unger, R.H., Eisentraut, A.M.
Special problems of the radioimmunoassay for
glucagon protein and polypeptide hormones
Excerpta Med. 84-86 (1968)
- 39 Vranic, M., Pek, S., Kawamori, R.
Increased glucagon immunoreactivity in plasma
of totally depancreatized dogs
Diabetes 23, 905-912 (1974)
- 40 Müller, W.A., Brennan, M.F., Tan, M.H., Aoki, T.T.
Studies of glucagon secretion in pancreatectomized
patients
Diabetes 23, 512-516 (1974)
- 41 Marco, J., Baroja, I.M., Diaz-Fierros, M.,
Villanueva, M.L., Valverde, I.
Relationship between insulin and gut glucagon-
like immunoreactivity GLI secretion in
normal and gastrectomized subjects
J. clin. Endocr. 34, 188-191 (1972)

- 42 Bloom, S.R., Royston, C.M.S., Thomson, J.P.S.
Enteroglucagon release in the dumping syndrome
Lancet II, 789-791 (1972)

- 43 Villanueva, M.L., Hedo, J.A., Marco, J.
Plasma glucagon immunoreactivity in a totally
pancreatectomized patient
Diabetologia 12 613-616 (1976)

- 44 Grawjer, L.A., Pildes, R.S., Horwitz, D.L. and
Rubenstein, A.H.
Control of juvenile diabetes mellitus and its
relationship to endogenous insulin secretion
as measured by C-Peptide immunoreactivity
J. Pediatr. 90, 42-48 (1977)

- 45 Ikeda, Y., Tajima, N., Minami, N., Ide, Y. and
Abe, M.
Pancreatic b-cell function in young diabetics
assessed by C-Peptide immunoreactivity
Jikeikai Med. J. 24, 113-122 (1977)

Meinem wissenschaftlichen und klinischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. Beyer, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit gewährt wurde. Ihm danke ich auch für die Überlassung der Glukagonantiseren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Krause für seine wertvollen Anregungen und seine tatkräftige und stete Hilfsbereitschaft, die er mir jederzeit gerne im Rahmen meiner Arbeit zukommen ließ.

Ich habe die Dissertation mit dem Titel

"Untersuchungen zur Sekretion des Entero-
glukagons beim Menschen nach totaler Duo-
denopankreatektomie"

selbstständig angefertigt. Ich habe außer
den im Schriftenverzeichnis angegebenen
Hilfsmitteln keine weiteren benutzt und
alle Stellen, die aus dem Schrifttum ent-
nommen sind, nach der Fundstelle unter
Angabe von Titel, Auflage und Erscheinungs-
jahr, Band und Seite des Werkes kenntlich
gemacht.

Lebenslauf

Am 27. September 1949 wurde ich in Döbersing Kreis Cham/Bayern geboren.

In Cham besuchte ich die Volksschule bis zur 4. Klasse und anschließend in Emmerich/Rhein die dortige Volksschule bis zum Abschluß.

Vom April 1964 bis September 1967 erlernte ich den Beruf des Chemielaboranten bei der Ruhrchemie AG in Oberhausen-Holten.

Vom Oktober 1967 bis Januar 1969 erwarb ich die Mittlere Reife an den Gewerblich-Technischen-Unterrichtsanstalten in Mülheim/Ruhr.

Ab Februar 1969 besuchte ich das Institut zur Erlangung der Hochschulreife in Oberhausen, wo ich am 24. Juni 1971 das Abitur bestand.

Im WS 71/72 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das Studium der Chemie und wechselte ab WS 72/73 zum Studium der Medizin über. Von meinem Chemiestudium wurde mir ein Semester zum Medizinstudium anerkannt.

Am 18. September 1973 legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung ab.

Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich am 2. Oktober 1974.

Am 16. September 1975 bestand ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und am 15. September 1977 den 2. Abschnitt. Die Ärztliche Prüfung legte ich am 26. Oktober 1978 in Mainz mit Erfolg ab und am 8. November 1978 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Am 10. Oktober 1975 heiratete ich meine Frau Ulrike, geb. Müller, ihr Beruf Ingenieur grad./Hochbau.

